

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO_3) sobre a
longevidade e envelhecimento de ratos Wistar**

LUCAS RANNIER RIBEIRO ANTONINO CARVALHO

**JOÃO PESSOA – PB
2021**

LUCAS RANNIER RIBEIRO ANTONINO CARVALHO

**Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO₃) sobre a
longevidade e envelhecimento de ratos Wistar**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
Orientador

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C331e Carvalho, Lucas Rannier Ribeiro Antonino.

Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO₃) sobre a longevidade e envelhecimento de ratos Wistar / Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho. - João Pessoa, 2021.
135 f. : il.

Orientação: Valdir de Andrade Braga.
Tese (Doutorado) - UFPB/CBiotec.

1. Longevidade. 2. Tempo de vida. 3. Nitrato de Sódio.
4. Curvas de sobrevivência. 5. Óxido Nítrico. I. Braga, Valdir de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

CDU 612.68(043)

LUCAS RANNIER RIBEIRO ANTONINO CARVALHO

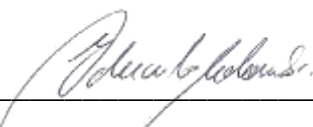
**Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO₃) sobre a
longevidade e envelhecimento de ratos Wistar**

Aprovação em: 31 / 03 / 2021

BANCA EXAMINADORA



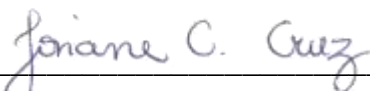
Prof. Dr. Deoclécio A. Chianca Júnior
Membro examinador externo



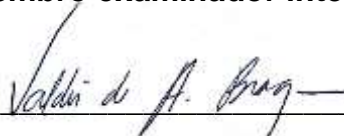
Prof. Dr. Eduardo Colombari
Membro examinador externo



Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
Membro examinador interno



Prof^a. Dr^a. Josiane de Campos Cruz
Membro examinador interno



Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
Orientador

JOÃO PESSOA – PB

2021

Dedicatória

Ao meu filho Arthur Paulino Carvalho, pela luz e amor em um nível nunca antes visto, por toda felicidade, ensinamentos e por me fazer uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao arquiteto da vida por me proporcionar tantas maravilhas. Agradeço pela saúde, paz e discernimento. Obrigado pela coragem, paciência e esperança em todos os momentos.

Ao meu filho Arthur Paulino Carvalho, a quem dedico este trabalho. Muito obrigado por toda luz, amor e compreensão. Por me fazer ver melhor a vida e o que realmente importa. Sou eternamente grato por ser o seu pai.

A minha companheira Maryanne Paulino, que acompanhou de perto cada etapa desse processo, muito obrigado por toda paciência, zelo, confiança, amor e companheirismo. Obrigado também por ser a melhor mãe que o nosso filho poderia ter.

A minha família, em especial meus pais Verônica Ribeiro e Elias Carvalho, por toda educação, cuidado e confiança para comigo. Obrigado pelo exemplo na minha criação e por toda compreensão durante esse período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, pela oportunidade de fazer parte de um laboratório e equipe tão significativos. Agradeço por toda confiança, ensinamentos e pelo exemplo pessoal e profissional.

Ao “grupo da longevidade”, Atalia, Ericka, Clara, Juliana, Apollo, Patrícia e Matheus. E ao meu amigo e colega de “apê”, Mickael. Muito obrigado pela amizade, confiança e por toda colaboração no decorrer deste trabalho, foi um enorme prazer dividir meus dias, alegrias, problemas e tudo mais com vocês.

Aos servidores técnicos Clênia, Sara e Matheus, além de todos os colegas que integram o Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) e demais laboratórios do Centro de Biotecnologia (CBiotec), os quais tive o prazer de conviver durante esse período, meu muito obrigado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, em especial a Prof^a Dr^a Ana Maria Castrucci, pela disponibilidade, conhecimentos e exemplo.

Aos colaboradores deste trabalho, Karolinska Institutet - Suécia, Centro de Ciências Agrárias (CCA-UFPB), Biotério Thomas George (UFPB), Programa Bioclin Pesquisadores e a Escola Técnica de Saúde (ETS-UFPB), agradeço por todo apoio e suporte técnico-científico.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB), o Centro de Biotecnologia (CBiotec), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte técnico e financeiro.

Por fim, meus mais sinceros votos de agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho tão importante para mim.

Somente os disciplinados são livres na vida. Se você é disciplinado, não é escravo do seu humor, é um escravo das suas paixões.

Eliud Kipchoge

RESUMO

CARVALHO, L.R.R.A. **Efeitos do consumo de nitrato inorgânico (NaNO₃) sobre a longevidade e envelhecimento de ratos Wistar**. 2021. 136f. (Tese em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

A busca com intervenções e fármacos que aumentem a longevidade e diminuam os efeitos do tempo sobre o organismo (envelhecimento), é tão antiga quanto a própria humanidade. Com base nas recentes descrições de efeitos benéficos dos nitratos sobre diversas condições de saúde, o consumo de vegetais ricos neste sal, como o espinafre e as folhas da beterraba, tem sido estimulado. No entanto, os efeitos crônicos dessa suplementação ainda não foram descritos e, devido seu potencial tóxico, avaliações a longo prazo são urgentes e necessárias. Sendo assim, com este trabalho objetivou-se a avaliação dos efeitos do consumo de nitrato de sódio sobre a longevidade e envelhecimento de ratos idosos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, com 15 meses de idade, suplementados continuamente com água de beber (placebo) ou solução nitrato de sódio (NaNO₃ - 10mM), até a morte natural por senescência. Durante o período de tratamento, os animais foram submetidos a acompanhamentos clínicos semanais e exames laboratoriais a cada três meses. Após a morte, foi realizada a avaliação da reatividade vascular e coleta de amostras para análise histopatológica e determinação da *causa mortis*. Os resultados demonstram que a suplementação com nitrato inorgânico, por longos períodos, não altera o tempo de vida e o envelhecimento dos indivíduos. Além disso, o consumo crônico foi responsável por uma significativa melhora no efeito e sensibilidade de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, sugerindo uma melhora da função vascular, sem indícios de tolerância. Quanto ao acompanhamento laboratorial, não foram demonstradas alterações causadas pelo nitrato, independente do sexo, apenas alterações relacionadas ao envelhecimento saudável. Similar ao diagnóstico da causa da morte, onde foram descritas alterações causadas pelo envelhecimento em quase todos os sistemas orgânicos, porém não houve diferenças entre os grupos. Dessa forma, foi possível concluir que a suplementação a longo prazo com nitrato inorgânico não interfere significativamente no tempo de vida e processo de envelhecimento saudável, sugerindo tratar-se de uma intervenção segura e de fácil acesso, para o consumo por longos períodos. No entanto, seus efeitos parecem ser dose-dependentes e estudos que avaliem seu custo-benefício são necessários.

Palavras-chave: Tempo de vida; nitrato de sódio; curvas de sobrevivência; óxido nítrico

ABSTRACT

CARVALHO, L.R.R.A. **Effects of consumption of inorganic nitrate (NaNO₃) on the longevity and aging of Wistar rats**. 2021. 136f. (Thesis in Physiological Sciences). Federal University of Paraíba, João Pessoa - PB.

The search for interventions and drugs that increase longevity and decrease the effects of time on the organism (aging), is as old as humanity itself. Based on recent descriptions of the beneficial effects of nitrates on various health conditions, the consumption of vegetables rich in this salt, such as spinach and beet leaves, has been encouraged. However, the chronic effects of this supplementation have not yet been described and, due to its toxic potential, long-term evaluations are urgent and necessary. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of sodium nitrate consumption on the longevity and aging of elderly rats. For that, Wistar rats of both sexes, 15 months old, were used, continuously supplemented with drinking water (placebo) or sodium nitrate solution (NaNO₃ - 10mM), until natural death by senescence. During the treatment period, the animals were submitted to weekly clinical follow-ups and laboratory tests every three months. After death, vascular reactivity was evaluated and samples were collected for histopathological analysis and determination of the cause of death. The results show that supplementation with inorganic nitrate, for long periods, does not alter the life span and aging of individuals. In addition, chronic consumption was responsible for a significant improvement in the effect and sensitivity of vasoconstrictor and vasodilator substances, suggesting a significant improvement in vascular function, with no evidence of tolerance. In the laboratory follow-up, no changes caused by nitrate, regardless of gender, were shown, only changes related to healthy aging. Similar to the diagnosis of the cause of death, in which alterations caused by aging have been described in almost all organic systems, however, there were no significant differences between groups. Thus, it was possible to conclude that long-term supplementation with inorganic nitrate does not significantly interfere with the life span and healthy aging process. Suggesting that it is a safe and easily accessible intervention for long-term consumption. However, its effects appear to be dose-dependent and studies that assess its cost-benefit are needed.

Keywords: Lifetime; sodium nitrate; survival curves; nitric oxide

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH – Acetilcolina

ALT - Alanina aminotransferase

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

ANGII – Angiotensina 2

ANOVA – Análise de variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATP – Trifosfato de Adenosina

COVID-19 – Doença do coronavírus 2019

EMAX – Efeito máximo

FA – Fosfatase Alcalina

FEN – Fenilefrina

GGT - Gamaglutamiltransferase

GH – Hormônio do crescimento

HCL – Ácido clorídrico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HE – Coloração de Hematoxilina e Eosina

HR – Hazard ratio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

JI – Jejum intermitente

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LOG – Logaritmo

NaNO₃ – Nitrato de Sódio

NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

NO – Óxido Nítrico

NO₂ – Nitrito

NO₃ – Nitrato

NOS – NO sintase

NPS – Nitroprussiato de sódio

Obj – Lente objetiva

pD2 – Co-logaritmo da concentração da droga que produz metade do efeito máximo

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RONS – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

SEM – Desvio padrão da média

SRAA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Biomarcadores do envelhecimento em uma interconexão hierárquica em três categorias. 24
- Figura 2.** Atualização dos biomarcadores do envelhecimento propostos por Lopéz-Otin e colaboradores (2013) e sua relação com o ambiente externo. ... 25
- Figura 3.** Influência dos principais fatores nutricionais sobre os mecanismos do processo de envelhecimento relacionados em modelos humanos e animais .. 29
- Figura 4.** Via nitrato-nitrito-óxido nítrico. 34
- Figura 5.** Rack ventilado Série Ventilife e mini-isoladores de polisulfona (1154cm² área piso). Imagem do fabricante: Alesco, 2020. 41
- Figura 6.** Avaliação do consumo diário de água suplementada ou não com nitrato inorgânico (10mM), em animais idosos de ambos os sexos. (A) Avaliação do efeito do sexo, consumo de fêmeas e machos (ambos os grupos). (B) Avaliação do efeito das intervenções por grupo experimental. 52
- Figura 7.** Tempo total de dias de vida de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo. (A) Efeito do tratamento sobre o tempo de vida (gêneros combinados). (B) Efeito do sexo sobre o tempo de vida (intervenções combinadas). 56
- Figura 8.** Tempo total de dias de vida de fêmeas (A) e machos (B) tratados com nitrato inorgânico por via oral a partir dos 15 meses de idade e solução placebo. 57
- Figura 9.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparação entre os grupos pelo teste de log-rank (dados de gênero combinados). 60
- Figura 10.** Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparação ponto-a-ponto pelo teste de Log-rank. Efeito do consumo de nitrato inorgânico e solução placebo em fêmeas (A) e machos (B) 61
- Figura 11.** Concentrações séricas de Malondialdeído (MDA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. 67
- Figura 12.** Concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. .. 72

Figura 13. Concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. .	73
Figura 14. Concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade.	74
Figura 15. Concentrações séricas de γ -glutamilttransferase (GGT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade ...	76
Figura 16. Concentrações séricas de colesterol (CT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade.	78
Figura 17. Concentrações séricas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade.. .	79
Figura 18. Alterações macroscópicas causadas pelo processo de envelhecimento saudável em rins humanos. Traduzido e adaptado de: Hommos et al., 2017.....	83
Figura 19. Concentrações séricas de creatinina em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade.....	85
Figura 20. Concentrações séricas de nitrogênio ureico (ureia) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade.....	86
Figura 21. Efeitos do processo de envelhecimento sobre o sistema cardiovascular, suas alterações fisiopatológicas e consequências	89
Figura 22. Curvas concentração-resposta para contração mediada pela FEN (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com endotélio funcional presente de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo (A), fêmeas (B) e machos (C).	91
Figura 23. Curvas concentração-resposta para contração mediada pela FEN (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com a ausência de endotélio funcional, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo (A), fêmeas (B) e machos (C).....	92

Figura 24. Curvas concentração-resposta para o relaxamento mediado pela ACH (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com endotélio funcional presente, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo (A), fêmeas (B) e machos (C).....	93
Figura 25. Curvas concentração-resposta para o relaxamento mediado pelo NPS (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com endotélio funcional presente, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo (A), fêmeas (B) e machos (C).....	94
Figura 26. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar idosos. (A1) Massa neoplásica encapsulada (75g), sensível a palpação, localizada na região inguinal sem aderências.	100
Figura 27. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar idosos. (A1) Massa neoplásica multinodular (114,2g), sensível a palpação, localizada na região cervical direita sem aderências	101
Figura 28. Alterações histopatológicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos componentes da avaliação bioquímica e metodologia utilizada. Informações do fabricante Bioclin® (Minas Gerais, Brasil).	44
Tabela 2: Composição da solução fisiológica Tyrode em mM (TANAKA et al., 1999).	45
Tabela 3: Comparação entre as técnicas estatísticas utilizadas nas análises convencionais “clássicas” e nas análises de sobrevivência.	59
Tabela 4: <i>Hazard ratio</i> e intervalo de confiança (95% CI) obtido a partir da análise das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os grupos experimentais (nitrato/placebo).	62
Tabela 5: Concentrações séricas de Malondialdeído (MDA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo	67
Tabela 6: Concentrações séricas de ALT e AST em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo	71
Tabela 7: Concentrações séricas de FA e GGT em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo	75
Tabela 8: Concentrações séricas de colesterol total e HDL em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo	77
Tabela 9: Concentrações séricas de creatinina e nitrogênio ureico (ureia) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo	84
Tabela 10: Valores (%) de Emax e de pD2 referentes ao efeito constritor da FEN em anéis da artéria mesentérica cranial de animais idosos, de ambos os sexos, tratados cronicamente com nitrato inorgânico e solução placebo.	90
Tabela 11: Valores (%) de Emax e de pD2 referentes ao efeito vasorelaxante da ACH e NPS em anéis da artéria mesentérica cranial de animais idosos, de ambos os sexos, tratados cronicamente com nitrato inorgânico e solução placebo. ...	95

Tabela 12: Descrição das alterações neoplásicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte..... 99

Tabela 13: Alterações patológicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte..... 102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Longevidade, história e sociedade	20
1.2 Biomarcadores do envelhecimento	22
1.3 Modelos animais para estudos de longevidade e envelhecimento	26
1.4 Nutrição, envelhecimento e longevidade	28
1.5 Nitrato dietético e via nitrato-nitrito-óxido nítrico	32
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Local	40
3.2 Animais	40
3.3 Delineamento experimental	41
3.4 Acompanhamento clínico	42
3.5 Avaliações bioquímicas periódicas	42
3.5.1 Estresse oxidativo	43
3.5.2 Avaliação hepática, renal e lipídica	44
3.6 Reatividade Vascular	44
3.7 Avaliação Histopatológica	46
3.8 Análise estatística	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Consumo de água e nitrato inorgânico (NaNO ₃)	50
4.2 Tempo de vida e curvas de sobrevivência	54
4.3 Avaliações bioquímicas.....	65
4.3.1 Estresse oxidativo	65
4.3.2 Atividade hepática	69

4.3.3 Atividade renal	81
4.4 Reatividade Vascular	87
4.5 Avaliação Histopatológica	96
5. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS.....	111
ANEXOS	130

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Longevidade, história e sociedade

Ao longo da história e do processo evolutivo, um fator marcante para a sobrevivência das espécies foi o “tempo de vida”. No tocante aos seres humanos, em comparação com as espécies que compartilham o mesmo ancestral, a expectativa de vida ao nascimento mais que dobrou ao longo de aproximadamente 300.000 gerações (Finch, 2010).

O aumento da longevidade de nossa espécie foi ainda mais expressivo nos últimos 200 anos, atingindo um crescimento médio de 2,5 anos a cada década (Flatt; Partridge, 2018). Sendo o tempo de vida máximo, documentado na França em 1997, referente a uma senhora que veio a óbito com 122 anos e 167 dias de idade, quase 50 anos a mais que a expectativa de vida da época na Europa (Guest, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020), em 2016 a expectativa de vida média em todo o globo foi de 72 anos, sendo 69,8 para os homens e 74,2 para as mulheres. No entanto, com variações notáveis entre os países, principalmente no tocante aos gastos em saúde, com uma relação positiva entre um maior investimento nessa área e aumento na expectativa de vida da população (Bein et al., 2018). No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2018 a expectativa de vida ao nascer dos brasileiros era de 76,3 anos, sendo 72,8 para homens e 79,9 para as mulheres, um aumento de mais de 30 anos em relação a 1940 (IBGE, 2020).

Com base nesses dados, parte das pessoas que vivem atualmente acima dos 60 anos supostamente estaria morta no passado. Esse aumento substancial da expectativa de vida dos humanos é resultado de diversos fatores desenvolvidos ao longo do processo evolutivo, dentre os quais ressaltam-se as mudanças socioambientais — como o estilo de vida, hábitos alimentares, segurança, higiene — e a maior atenção com a população infantil e idosa. Além disso, também as mudanças do ponto de vista médico, como o aprimoramento dos cuidados a saúde em todas as idades, redução dos impactos causados por doenças infecciosas, protocolos de imunização, antibióticos, técnicas cirúrgicas

e demais ferramentas e recursos destinados à saúde (Flatt; Partridge, 2018; Guest, 2019).

No entanto, viver mais ou para além das expectativas traz consigo uma série de desafios fisiopatológicos inerentes ao processo de envelhecimento. A idade é um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de doenças em humanos, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Niccoli; Partridge, 2012; López-Otín et al., 2013; Abiri; Vafa, 2019).

Para além das questões individuais que envolvem a saúde dos indivíduos longevos, um aumento da idade média das populações também reflete em mudanças e adaptações socioeconômicas (Carone et al., 2005). A seleção natural age contra o envelhecimento impedindo o crescimento demasiado da população. No entanto, a espécie humana tende a burlar esse efeito e continua “crescendo”, tanto em quantidade de indivíduos quanto em tempo de vida, sendo possível observar que as pessoas com mais de 85 anos formam a parcela da sociedade com maior crescimento entre as faixas etárias (Hill et al., 2016).

Kontis e colaboradores (2017) avaliaram por meio de projeções estatísticas a taxa de mortalidade e a expectativa de vida para 2030 em 35 países industrializados com dados de alta qualidade. De acordo com o estudo, a expectativa de vida aumentará em todos os países, com diminuição da diferença entre homens e mulheres. Ademais, os autores demonstram que o aumento da longevidade dos indivíduos está relacionado com a implantação de políticas de apoio ao envelhecimento saudável, investimentos em saúde e assistência social, além de reformulações no eixo educação-trabalho-aposentadoria (Kontis, et al. 2017).

No Brasil, em 2018 eram mais de 23 milhões de pessoas com 60 anos ou mais de idade, compondo 13% da população. Em 1980, a cada mil pessoas que chegavam aos 60 anos, 344 atingiam os 80 anos de idade; em 2018, este valor passou para 599 indivíduos, um aumento de 74%. As projeções realizadas no país indicam que em 2060 os idosos (com mais de 65 anos) representarão 25,49% da população, correspondendo a mais de 58 milhões de pessoas (IBGE, 2020).

Diante deste fenômeno, dos pontos de vista demográfico, político, social e da saúde, há uma constante necessidade de encontrar maneiras de manter os

indivíduos saudáveis por mais tempo, preservando as funções orgânicas e impedindo ou retardando o surgimento de doenças. Essa busca, que acompanha a história da sociedade humana, compõe um dos mais desafiadores campos de estudo nas áreas da saúde, tecnologia e ciências biológicas.

1.2 Biomarcadores do envelhecimento

A busca pela compreensão do processo de envelhecimento para o desenvolvimento de formas que ampliem a saúde e a vida útil dos indivíduos (aumento da longevidade), é tão antiga quanto a própria humanidade. Este grande enigma passou a ser extensivamente estudado a partir dos anos 30, com as primeiras descrições do envelhecimento como resultado do processo de seleção natural (Fisher, 1930; Haldane, 1941). No entanto, o marco para os estudos modernos sobre envelhecimento foi o isolamento das primeiras cepas de vida longa (*Caenorhabditis elegans*, uma espécie de nematódeo da família Rhabditidae), em 1983 (Klass; Hirsh, 1983).

A evolução desses estudos fornece as bases para a compreensão dos efeitos do estilo de vida e fatores ambientais sobre a longevidade, assim como as bases celulares e moleculares envolvidas no processo de envelhecimento (López-Otin et al., 2013). As pesquisas nesse campo apresentam muitos paralelos com os estudos oncológicos, que ganharam mais embasamento a partir da descrição dos seis biomarcadores do câncer nos anos 2000, com atualização para dez (10) marcadores em 2011 (Hanahan; Weinberg, 2011). Tal categorização ajudou a conceituar as bases e vias essenciais para o processo de desenvolvimento do câncer e pontuar seus mecanismos adjacentes. Além disso, serviu como modelo para a categorização dos biomarcadores celulares e moleculares do envelhecimento, que foi proposta por López-Otin e colaboradores (2013), a partir de critérios específicos e obrigatórios.

Os biomarcadores deveriam: (1) manifestar-se durante o envelhecimento normal; (2) seu agravamento experimental causar a aceleração do envelhecimento e (3) sua melhoria experimental causar o retardo no processo de envelhecimento e aumentar a expectativa de vida.

Dessa forma, López-Otin e colaboradores (2013), elencaram nove biomarcadores do processo de envelhecimento:

- (1) **Instabilidade genômica:** Acúmulo de dano genético ao longo da vida, seja dano direto a arquitetura e DNA nuclear, ao DNA mitocondrial ou ambos.
- (2) **Desgaste telomérico:** A maioria das células somáticas não expressam a telomerase, que resulta em encurtamento dos telômeros e na perda progressiva da capacidade proliferativa das células.
- (3) **Alterações epigenéticas:** Envolvem alterações nos padrões de metilação do DNA, modificação pós-traducional de histonas e remodelação da cromatina.
- (4) **Perda da proteostase:** Refere-se aos distúrbios nos mecanismos que promovem a estabilidade, funcionalidade e degradação das proteínas.
- (5) **Detecção de nutrientes desregulada:** Alterações nas vias de sinalização intracelular para os nutrientes, redução das funções de hormônios como GH, IGF-1 e insulina.
- (6) **Disfunção mitocondrial:** Redução da produção de ATP e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).
- (7) **Senescência celular:** Parada estável do ciclo celular acoplada a alterações fenotípicas estereotipadas à nível celular.
- (8) **Exaustão de células-tronco:** Declínio do potencial regenerativos dos tecidos.
- (9) **Comunicação intercelular alterada:** Desregulação das secreções endócrinas, neurócrinas e neuronais, além de alterações na responsabilidade dos tecidos, disfunções imunológicas e alterações dos micro-ambientes.

Esses marcadores são divididos em três grandes grupos: primários, antagonistas e integrativos (Figura 1). Os biomarcadores primários, como o próprio nome sugere, são aqueles que se desenvolvem de forma espontânea com o decorrer do tempo e são essencialmente deletérios à função orgânica (instabilidade genômica, desgaste telomérico, alterações epigenéticas e perda da proteostase). Já os antagonistas, têm efeito contrário aos primários e são inicialmente benéficos dependendo da intensidade, no entanto, com o passar do tempo e o aumento da estimulação passam a ser deletérios ao organismo (desregulação na detecção aos nutrientes, disfunção mitocondrial e senescência

celular). E por fim, os biomarcadores integrativos, que são resultado dos efeitos supracitados ao longo do tempo, afetando diretamente a homeostase e a função de todos os tecidos (exaustão das células-tronco e alterações na comunicação intracelular)(López-Otin et al., 2013).

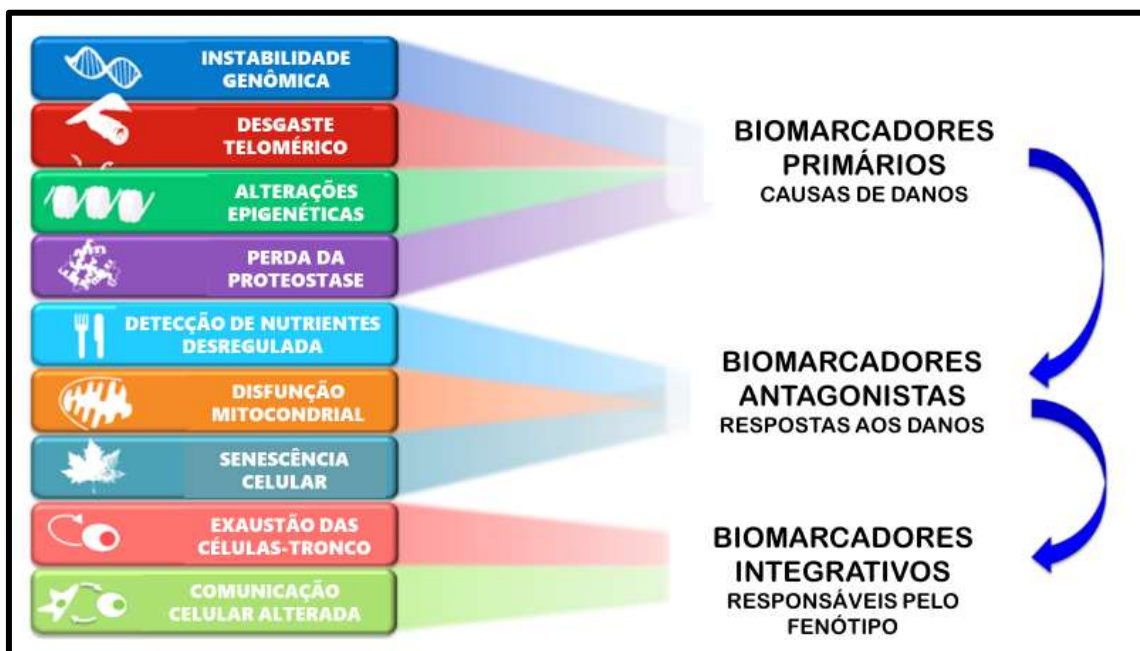


Figura 1. Biomarcadores do envelhecimento em uma interconexão hierárquica em três categorias. Fonte: Traduzido de López-Otin et al. 2013.

Partridge e colaboradores (2018) revisaram e tabelaram os efeitos benéficos de uma série de intervenções em cada um dos biomarcadores do envelhecimento. Também pontuaram as mudanças com relação a idade e saúde (estudos observacionais), e os efeitos adversos apresentados pelas intervenções nos biomarcadores. O estudo ainda cita a preocupação com a porção crescente de idosos não saudáveis, e reforça a importância dos bons hábitos para um estilo de vida saudável e seu paralelo com o processo de envelhecimento (Partridge et al., 2018).

Ainda no tocante à regulação genética do envelhecimento, Singh e colaboradores (2019) discutem a interação entre os biomarcadores, além das relações entre a base genética e os efeitos ambientais sobre o envelhecimento. Os autores propõem uma visão integrada deste processo ao longo do tempo, com a possibilidade de que alterações em qualquer um dos marcadores possa refletir em distúrbios nos demais (analogia mecânica) e, como consequência, na

progressão do fenótipo. Além disso, ainda adicionam nesse eixo integrativo, a influência externa do ambiente, como a dieta e as atividades físicas, e pontuam a influência de marcadores ainda desconhecidos (Figura 2) (Singh et al., 2019).

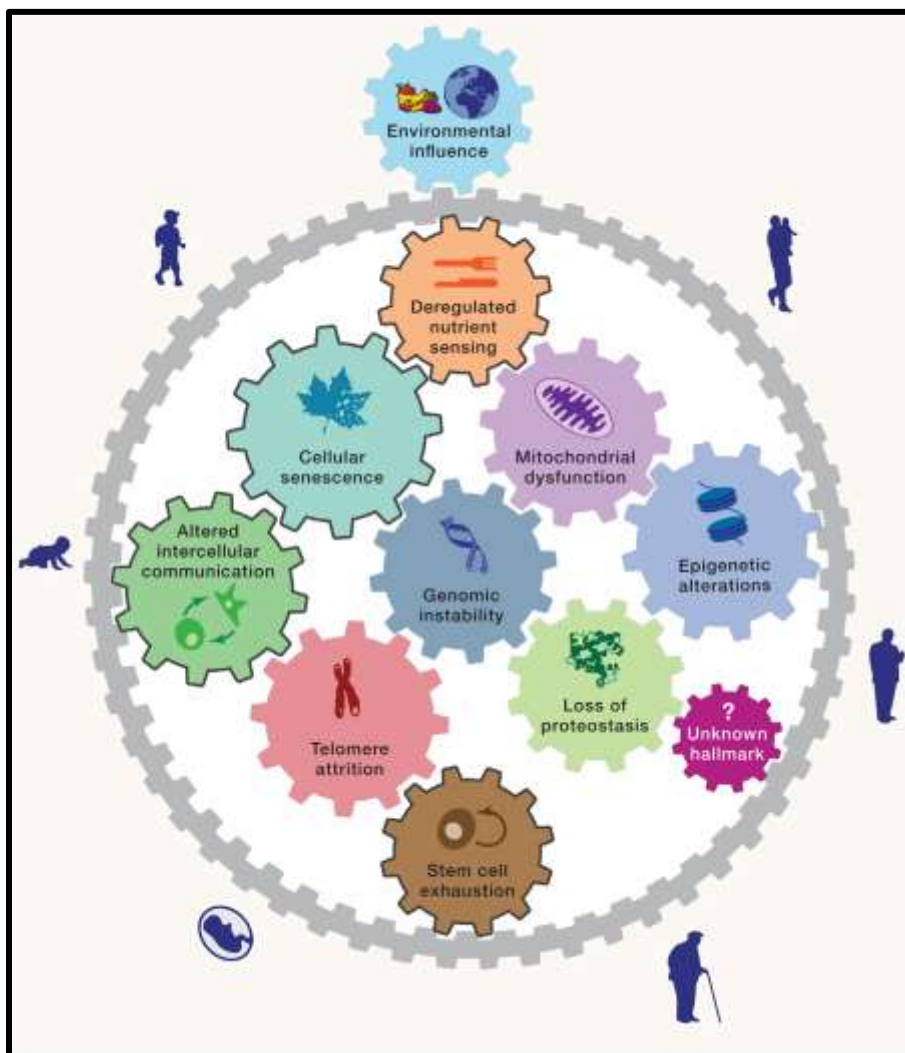


Figura 2. Atualização dos biomarcadores do envelhecimento propostos por López-Otin e colaboradores (2013) e sua relação com o ambiente externo. Adaptado de: Singh et al., 2019.

Finalmente, a descrição dos biomarcadores inerentes ao processo de envelhecimento e suas relações entre si e com o meio externo permitem o aprimoramento da compreensão das bases fisiopatológicas do processo. Para mais, promove a fundamentação para o desenvolvimento de novas estratégias que objetivem a extensão da vida útil dos indivíduos de forma saudável (Partridge et al., 2018).

1.3 Modelos animais para estudos de longevidade e envelhecimento

Em uma pesquisa realizada em janeiro de 2021 na base de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos (www.pubmed.gov), as palavras “aging” e “longevity” apresentaram mais de 550.000 resultados desde 1786, com um aumento expressivo de 91% a partir de 1983, o marco para os estudos modernos (Klass; Hirsh, 1983; NCBI, 2021). A maioria dos trabalhos sobre envelhecimento usa os mesmos fenótipos: (1) vida útil (idade até morte); (2) longevidade (indivíduos com idade avançada); (3) longevidade excepcional (indivíduos que atingem ou excedem uma idade específica) e (4) envelhecimento saudável (uma combinação de envelhecimento e saúde) (Brooks-Wilson, 2013).

No entanto, cabe ressaltar que o estudo do envelhecimento humano, por se tratar de uma espécie com tempo de vida relativamente longo (aproximadamente 70 anos – vide 1.1), apresenta uma série de desafios metodológicos, especialmente dos pontos de vista ético, financeiro e temporal. Frente a tais dificuldades, uma série de modelos experimentais alternativos para o estudo do processo de envelhecimento e longevidade foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas, como revisado por Folch e colaboradores (2018).

Os modelos animais para os estudos a longo prazo objetivam avaliar os mecanismos do envelhecimento em indivíduos com expectativa de vida mais curta, e são classificados em: metodologias *in vitro* (Yang et al., 2018) e *in vivo*, este último utilizando animais invertebrados e vertebrados.

Nesse aspecto, atualmente, os principais modelos experimentais para o estudo do processo de envelhecimento e longevidade utilizam nematódeos (*Caenorhabditis elegans*) (Shen et al., 2018), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Zimmermann et al., 2018), moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*) (Moretti et al., 2020), peixes (*Nothobranchius furzeri*) (Platzer; Englert, 2016), roedores (camundongos e ratos) (Wang et al., 2018), cães e primatas não humanos (Colman et al., 2014).

Entretanto, devido às características peculiares de cada espécie, os modelos experimentais pré-clínicos apresentam diferentes pontos fortes e limitações e, portanto, devem ser ponderados e discutidos de acordo com o

objetivo de cada estudo. Por exemplo, os modelos que envolvem animais invertebrados são mais rápidos devido à expectativa de vida curta dos indivíduos, além de apresentarem custos de pesquisa mais baixos. No entanto, apresentam limitações consideráveis devido às diferenças fisiológicas significativas, sobretudo no que se refere à metabolização de substâncias, principal alvo das pesquisas antienvhecimento (Folch et al., 2018).

Ainda nesse âmbito, estudos com vertebrados, sobretudo mamíferos, apresentam similaridades fisiológicas mais acentuadas quando comparados aos humanos. Por exemplo, os modelos com cães e primatas não humanos são os mais adequados para a translação dos resultados. No entanto, além do ponto de vista ético, apresentam custo de pesquisa elevado e um tempo experimental relativamente longo.

Diante deste cenário, destacam-se os modelos pré-clínicos utilizando roedores, pois além da similaridade fisiológica com humanos, ainda apresentam expectativa de vida curta, o que reduz consideravelmente tempo, mão-de-obra e custos envolvidos na pesquisa (Folch et al., 2018; Azman; Zakaria, 2019).

Além das características próprias do envelhecimento das espécies, diversas biotécnicas foram desenvolvidas para potencializar os modelos animais, principalmente no que se refere aos estudos com roedores. Destacam-se a administração crônica de D-galactose, que causa deterioração das habilidades cognitivas e motoras semelhantes aos sintomas do envelhecimento (Wang et al., 2018; Azman; Zakaria, 2019), as linhagens endogâmicas com tendência à senescência (SAMP) e os camundongos mutantes *klotho*, caracterizados por uma deleção no gene *klotho* e a expressão rápido do fenótipo do envelhecimento (Bartolone et al., 2020).

Dessa forma, mesmo havendo uma diferença significativa entre o tempo máximo de vida entre humanos e roedores, uma vez que a expectativa de vida de ratos de laboratórios utilizados em modelos experimentais é de 2,5 a 3,5 anos, com média de 3 anos, e em humanos aproximadamente 70 anos, esses modelos pré-clínicos ainda apresentam destaque na gerontologia (estudo do processo de envelhecimento) (Andreollo et al., 2012; Sengupta, 2013).

1.4 Nutrição, envelhecimento e longevidade

O tempo de vida dos humanos é modulado pelo ajuste entre os fatores genéticos, ambientais e o estilo de vida, que determinam ininterruptamente as atividades fisiológicas do organismo e sua deterioração funcional dependente do tempo, além da progressão e susceptibilidade a doenças. Entretanto, esses fatores não atuam de forma igualitária sobre o envelhecimento, estimando-se que apenas 20-30% desse controle seja determinado pelos fatores genéticos, com um aumento gradativo dessa proporção com o passar do tempo (Hjelmborg et al., 2006; Ekmekcioglu, 2019).

Desse modo, os determinantes principais do envelhecimento saudável e consequentemente do tempo de vida, são os fatores ambientais e o estilo de vida (Vidaček et al., 2017). Estudos que observam o estilo de vida das pessoas em regiões com maior proporção de idosos, como Sardenha (Itália), Nicoya (Costa Rica) e Okinawa (Japão), descrevem alguns hábitos comuns que são associados ao envelhecimento saudável e maior expectativa de vida. Como destaques: a prática de atividade física regular, ausência de vícios como o tabagismo, engajamento social e propósito de vida, espiritualidade, manutenção da massa corporal normal e uma dieta saudável com refeições menores e pouco calóricas, além de alto consumo de vegetais, frutas e grãos integrais (Rizzuto; Fratiglioni, 2014; Buettner; Skemp, 2016; Pignolo, 2019).

Ainda nesse aspecto, alimentos, dietas e nutrientes especiais podem influenciar diretamente o risco de doenças e mortalidade em humanos, interferindo na sobrevivência do indivíduo, abordagem que desperta interesse pelo baixo custo e fácil acesso (Vidaček et al., 2017). No entanto, a influência negativa dos padrões alimentares também deve ser considerada. Nesses casos, as desregulações nutricionais associadas aos hábitos sedentários são descritas como fatores de risco para a obesidade, diabetes, hipertensão e dislipidemia, que representam 4 dos 10 maiores fatores para mortalidade por todas as causas em todo o mundo, com reflexo direto no tempo de vida das populações (Lacroix et al., 2017).

Alguns mecanismos do processo de envelhecimento, podem ser modulados por intervenções metabólicas, alimentos, dietas e nutrientes especiais (Figura 3) (López-Otin et al., 2016; Ekmekcioglu, 2019), como também por drogas como a metformina (Piskovatska et al., 2019). Dentre esses mecanismos, principalmente os que envolvem o metabolismo e replicação

celular, como: desregulação na detecção de nutrientes e nas vias de crescimento, incluindo AMPK (proteína cinase ativada por AMP), SIRT1 (sirtuínas), mTOR (proteína alvo da rapamicina dos mamíferos) e insulina/IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1), modificações epigenéticas e na autofagia celular, inflamação crônica de baixo grau (“inflammaging”), senescência celular, estresse oxidativo e desgaste telomérico (López-Otin et al., 2013; Ma; Gladyshev, 2017; Singh et al., 2019).



Figura 3. Influência dos principais fatores nutricionais sobre os mecanismos do processo de envelhecimento relacionados em modelos humanos e animais. Fonte: Traduzido e adaptado de Ekmekcioglu (2019).

Nesse contexto, foi primeiramente descrito por McCay e colaboradores (1939) em ratos de ambos os sexos que a restrição calórica (diminuição da ingestão alimentar em 40%) conduziria a um aumento considerável do tempo de vida dos indivíduos. Esse efeito foi posteriormente reproduzido em diversos modelos experimentais de leveduras, platelmintos e animais, demonstrando ser bastante promissor, tanto pelo efeito no aumento da longevidade quanto no retardo do aparecimento de doenças associadas a idade e a prevenção de diabetes e doenças autoimunes (Omodei; Fontana, 2011; Simsek et al., 2019).

Estudos conduzido por mais de 20 anos no Centro Nacional de Pesquisa de Primatas de Wisconsin (EUA), avaliaram o envelhecimento de macacos

Rhesus submetidos a restrição calórica de 30% em comparação a um grupo controle com alimentação *ad libitum*. A restrição calórica foi responsável por melhorias metabólicas, cardiovasculares e da função cerebral, além da prevenção de câncer e diabetes tipo 2, e redução da mortalidade (Colman et al., 2009; Colman et al., 2014).

Além da restrição calórica, as proporções dos macronutrientes na dieta também são alvo de diversos estudos. Nesse âmbito, os efeitos benéficos sobre a longevidade são maiores na restrição de proteínas, quando comparados à restrição de carboidratos e gorduras da dieta (Solon-Biet et al., 2014; Mirzaei et al., 2014). Solon-Biet e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos da restrição proteica sobre a longevidade de ratos e constataram um aumento considerável (30 semanas) na expectativa de vida, efeito relacionado com a supressão da ativação do mTOR. Além disso, efeitos metabólicos e cardiovasculares também foram observados.

A restrição de aminoácidos sulfurados, em especial a metionina, também reflete em diversos efeitos metabólicos, estresse oxidativo e nas doenças relacionadas a idade, independente da restrição calórica. A redução da ingestão de metionina promove o aumento dos níveis de IGF-1, melhora a resposta autofágica das células e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias, podendo influenciar diretamente o processo de envelhecimento e a longevidade (Martínez et al., 2017; Dong et al., 2018).

Outra abordagem conhecida é o jejum intermitente (JI). O termo se refere ao comportamento alimentar dividido em períodos de ingestão normal de alimentos e períodos de restrição energética, com uma série de abordagens e protocolos diferentes (Stockman et al. 2018). No tocante aos efeitos sobre a longevidade, o JI é relacionado com melhorias metabólicas e cardiovasculares, além da expressiva perda de peso (Wei et al., 2017). Em animais, o jejum de dias alternados levou ao aumento da sobrevivência de moscas (*Drosophila melanogaster*), no entanto, em roedores seu papel ainda é controverso e precisa ser melhor explorado (Longo; Panda, 2016; Catterson et al. 2018).

Alguns componentes isolados também apresentam efeitos consideráveis no tocante ao envelhecimento, como o resveratrol, a espermidina e as vitaminas e compostos antioxidantes. O resveratrol, um polifenol encontrado no vinho tinto e nas uvas, é muitas vezes taxado como “droga anti-envelhecimento”, devido a

seus efeitos benéficos contra doenças associadas ao envelhecimento e estresse oxidativo. Os efeitos do resveratrol são mediados pela ativação das sirtuínas (SIRT1), que participam do sistema de detecção de energia celular além da ativação da AMPK, induzindo especialmente efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citoprotetores (Kulkarni; Cantó, 2015; Li et al., 2018).

Já a espermidina, uma poliamina encontrada em uma ampla variedade de alimentos, incluindo cogumelos, legumes, milho e grãos integrais, além de ser sintetizada por bactérias probióticas no intestino, afetam o crescimento e proliferação celular, atuam como antioxidantes e influenciam a apoptose e atividade enzimática celular (Madeo, et al. 2018). Alguns estudos relatam que a suplementação com espermidina foi responsável pelo aumento da sobrevida em invertebrados e células humanas *in vitro*. Esses dados, associados ao fato de que as concentrações de espermidina caem com a idade, sugerem que a suplementação com essa poliamina pode ser favorável ao processo de envelhecimento, no entanto, mais estudos são necessários (Eisenberg et al., 2009; Eisenberg et al., 2016; Ekmekcioglu, 2019).

Neste cenário, muitos trabalhos têm citado a suplementação com vitaminas antioxidantes e compostos sintéticos que podem prolongar o tempo de vida de modelos animais. A título de exemplo, pode-se citar a vitamina C, maior antioxidante hidrofílico e potente inibidora da peroxidação lipídica, e a vitamina E, principal antioxidante hidrofóbico em membranas celulares e lipoproteínas circulantes (Sadowska-Bartosz, Bartosz, 2014).

Outro exemplo seria a curcumina, cujos efeitos agem diretamente como antioxidante, mas seus mecanismos no prolongamento da vida parecem ser dependentes principalmente de suas ações antioxidantes indiretas (Shishodia, 2013; Kumar et al., 2018). Pu e colaboradores (2013) demonstraram que a suplementação com curcumina melhora a elasticidade de artérias de grande calibre associadas ao envelhecimento pela idade, a disfunção endotelial vascular mediada pelo óxido nítrico, o estresse oxidativo e o aumento no colágeno (Pu et al., 2013).

Diante disso e sabendo que é impossível parar ou impedir o processo de envelhecimento, o principal objetivo das intervenções dietéticas é conduzir este processo da forma mais saudável possível, reduzindo o surgimento de doenças, disfunções, incapacidades e demências inerentes à vida e à passagem do

tempo. Tal conceito é classicamente resumido pela frase do antropólogo Ashley Montagu (1905-1999): “A ideia é morrer jovem o mais tarde possível” (Ekmekcioglu, 2019).

1.5 Nitrato dietético e via nitrato-nitrito-óxido nítrico

Existem duas fontes principais para obtenção dos nitratos pelos mamíferos: clássica e dietética. A chamada via clássica ocorre a partir da oxidação do óxido nítrico (NO) endógeno, formado em quase todas as células pelas enzimas óxido nítrico sintases dependentes de L-arginina (NOSs). Já a via dietética, acontece através do consumo de fontes ricas em nitratos por via oral (Lundberg; Weitzberg, 2013; Lundberg et al., 2018).

Os nitratos inorgânicos são sais solúveis em água que ocorrem naturalmente na natureza, formados por um ânion nitrato (NO_3) ligado a um cátion metálico, mais comumente cátions sódio (Na^+) e potássio (K^+), formando o nitrato de sódio (NaNO_3) e nitrato de potássio (KNO_3), respectivamente (Omar et al., 2012). Através dessa reação, os nitratos disponíveis na natureza — presentes na água e no solo — podem ser captados pelas plantas, especialmente vegetais de folhas verdes escuras (Brkic et al., 2017).

Por não sofrer metabolismo de primeira passagem no fígado, os nitratos inorgânicos podem ser consumidos por via oral (Omar et al., 2012). A ingestão pode ser feita tanto na forma isolada, como na forma de nitrato de sódio (NaNO_3), ou através da ingestão de vegetais de folhas verdes ricos em nitrato, como alface, espinafre, acelga, rúcula e beterraba. De forma acumulativa, alguns desses vegetais podem conter até mais de 250mg de nitrato por 100g de peso fresco (Brkic et al., 2017; Salehzadeh et al., 2020). Jonvik e colaboradores (2016) propuseram um estudo para avaliar as concentrações séricas de nitrato após o consumo de diferentes fontes alimentares. Demonstrou-se o aumento progressivo dependente da dose nas concentrações de nitrato e nitrito no plasma após a ingestão de nitrato de sódio dissolvido em água e sucos de beterraba, rúcula e espinafre.

Após a ingestão, os nitratos inorgânicos são prontamente absorvidos no estômago e nas porções iniciais do intestino e possuem meia-vida plasmática de aproximadamente 5 (cinco) horas (Lundberg et al., 1994; Gilchrist et al., 2010;

Lundberg et al., 2018). Grande parte do total absorvido é excretado através do sistema renal, no entanto, aproximadamente 25% é seletivamente armazenado e concentrado nas glândulas salivares, de modo que na saliva a concentração de nitrato pode ser até 20x maior que no plasma (Spiegelhalder et al., 1976; Gilchrist, 2010; Lundberg et al., 2011).

A excreção de saliva rica em nitrato na cavidade oral permite que as bactérias comensais anaeróbicas facultativas da superfície dorsal da língua reduzam aproximadamente 20% do nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2) durante a respiração anaeróbica pela ação de nitrato redutases (Bryan et al., 2017). Essa relação com a flora bacteriana da cavidade oral foi particularmente avaliada por Woessner e colaboradores (2016), que constataram a redução das concentrações salivares e plasmáticas de nitrito após o uso de enxaguantes e antissépticos bucais.

Todavia, após a deglutição em condições normais, a saliva entra em contato com o ácido estomacal (HCl), que promove a formação de ácido nitroso (HNO_2) e sua decomposição em óxido nítrico (NO) e outros óxidos de nitrogênio ainda no estômago (Lundberg et al., 1994; Benjamin et al., 1994). Além disso, parte do NO_2 que é formado na cavidade oral é absorvido e entra na circulação sistêmica, havendo um pico duas a três horas após o consumo de NO_3 (Jones et al., 2018).

Na circulação, o NO_2 é facilmente distribuído para os tecidos e pode ser utilizado para a geração de óxidos de nitrogênio bioativos pelas reações de nitratação e nitroação, pouco conhecidas (Lundberg et al., 2018). Além disso, o nitrito pode ser convertido em NO através de reações catalisadas pelas mitocôndrias (Kozlov et al., 1999), xantina oxidase (Zhang et al., 1998), desoxiemoglobina (Cosby et al., 2003), desoximioglobina (Shiva et al., 2007), aldeído oxidase (Li et al., 2008) e até pela NOS em condições de anóxia e hipóxia (Vanin et al., 2007).

Essa via de disponibilização de óxido nítrico através da redução do nitrato e nitrito provenientes da dieta, chamada de via enterosalivar nitrato-nitrito-óxido nítrico (Figura 4) (revisada por Lundberg et al., 2018), por ser independente de oxigênio é bastante acentuada em condições de hipóxia e acidose (Modin et al., 2001; Castello et al., 2006). Nos últimos anos ela vem sendo objeto de extensas pesquisas devido ao seu potencial terapêutico nas doenças cardiovasculares e metabólicas além de outras condições patológicas (Carlstrom et al., 2010, Lundberg et al., 2018).

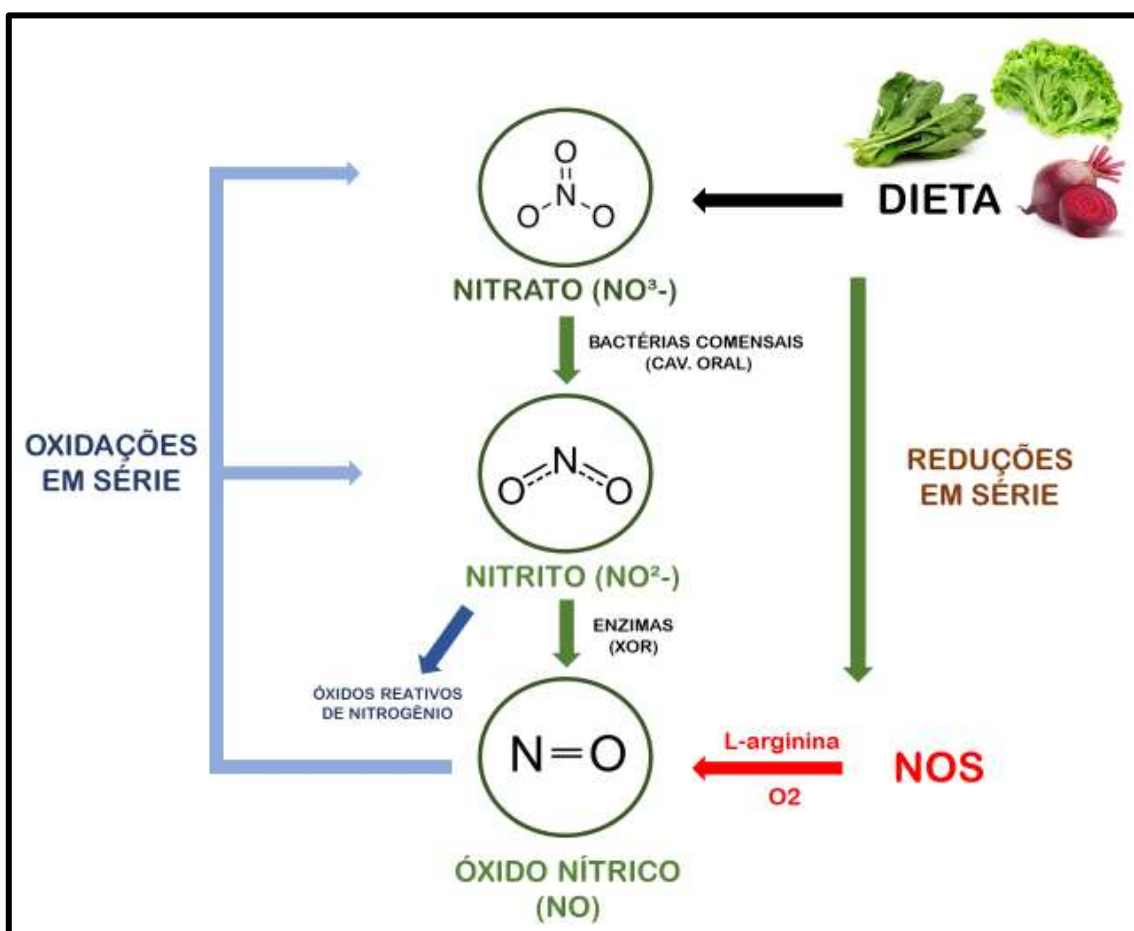


Figura 4. Via nitrato-nitrito-óxido nítrico. Fonte: Traduzido e adaptado de Carlstrom; Montenegro, 2019.

Por décadas, os nitratos inorgânicos como nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) e nitrato de potássio (KNO_3), foram utilizados como conservantes de alimentos, principalmente para cura de carnes (Binkerd; Kolari, 1975). Os primeiros registros da utilização dos nitratos inorgânicos com fins medicinais datam do início do século VIII na China, por meio da administração por via oral no

tratamento de doenças cardiovasculares, como a *angina pectoris* (Butler; Feelisch, 2008).

Ao longo da história, os nitratos não foram tão explorados para fins medicinais. Devido ao seu potencial carcinogênico, pouco conhecimento sobre as doses terapêuticas e aos relatos de intoxicação por nitrito, sua utilização foi limitada ao tratamento das intoxicações por cianeto e sulfeto de hidrogênio (Butler; Feelisch, 2008).

No entanto, nas últimas duas décadas o uso médico do nitrato dietético tem sido novamente encorajado, grande parte devido aos recentes achados benéficos à saúde geral dos indivíduos, como redução do estresse oxidativo e disfunção endotelial (Tian et al., 2020), pressão arterial (Larsen et al., 2006), eficiência mitocondrial (Larsen et al., 2011), fluxo sanguíneo cerebral (Fan et al., 2019), melhora da performance (Jones et al., 2018; Van der Avoort et al., 2018), entre outros.

Ademais, há também os seus efeitos positivos sobre condições patológicas específicas, como nas lesões renais por isquemia-reperfusão (Zhang et al., 2020), aterosclerose (Khambata et al., 2017), esteatose hepática (Cordero-Herrera et al., 2018), infarto agudo do miocárdio (Gonzalez et al., 2008), síndrome metabólica (Carlstrom et al., 2010) e diabetes tipo 2 (Gheibi et al., 2018; Khorasani et al., 2019). Vale salientar ainda que a deficiência de nitratos e nitritos é associada ao desenvolvimento de condições patológicas, como disfunção endotelial, alterações cardiovasculares e síndrome metabólica, o que pode reforçar sua indicação médica (Kina-Tanada et al., 2017).

A maioria dos estudos que envolvem a via enterosalivar nitrato-nitrito-óxido nítrico promove avaliações a curto prazo de seus efeitos, e poucos estudos são realizados com a população idosa ou modelos animais voltados ao fenótipo do envelhecimento saudável e longevidade. Neste contexto, Sim e colaboradores (2019) descrevem a relação entre o aumento do consumo de nitrato dietético com a melhor função muscular em idosos (idade média $75,2 \pm 2,7$ anos).

Ainda do ponto de vista funcional, Coggan e colaboradores (2019) demonstram que a ingestão única de suco de beterraba ($140 \text{ ml} = 13,4 \pm 1,6 \text{ mmol}$ de nitrato inorgânico), resulta em uma expressiva melhora na força e potência da extensão do joelho em homens e mulheres idosos (Idade média 71 ± 5 anos),

quando comparados ao grupo controle. Tal descoberta ressalta os benefícios do consumo de nitrato sobre o declínio funcional muscular característico do processo de envelhecimento.

Já no tocante aos efeitos do nitrato dietético sobre as populações a longo prazo, estudos prospectivos na Austrália relatam benefícios e uma correlação negativa entre consumo de nitrato inorgânico com a mortalidade por doenças cardiovasculares em idosos (Liu et al., 2018) e aterosclerose em mulheres também idosas (Bondonno et al., 2017). No entanto, em um estudo prospectivo com mais de 60 mil mulheres americanas, Jackson e colaboradores (2019) descrevem que o aumento na ingestão habitual de vegetais ricos em nitratos não estava associado com um menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares a longo prazo.

Desse modo, estudos que avaliem a influência do consumo de nitrato inorgânico a longo prazo e seus mecanismos sobre o processo de envelhecimento, o surgimento de doenças relacionadas a idade e o tempo de vida dos indivíduos são necessários.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do consumo crônico de nitrato inorgânico (NaNO_3) por via oral sobre o envelhecimento e a longevidade de ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Em ratos Wistar machos e fêmeas, que consumiram nitrato inorgânico a partir dos 15 meses de idade até o óbito, pretendemos:

- Determinar e comparar os efeitos da intervenção sobre a longevidade e expectativa de vida;
- Analisar e comparar os indicadores de estresse oxidativo, função renal, hepática e perfil lipídico no envelhecimento;
- Investigar as causas de morte mais prevalentes em animais de laboratório e a relação de risco com o consumo de nitrato cronicamente;
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com nitrato e o processo de envelhecimento sobre a reatividade vascular e a ingestão hídrica diária;
- Investigar a relação do sexo sobre os parâmetros avaliados acima descritos.

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA), do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPB), sob o parecer de número 1975060318 (anexo 1) e foi conduzido de acordo com os princípios éticos preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2019).

3.2 Animais

Foram utilizados 200 ratos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e fêmeas, com 14 meses de idade (aproximadamente 60 semanas), pesando entre 250 e 450 gramas. Os animais foram provenientes da Unidade de Produção Animal - Biotério Prof. Thomas George da UFPB, e após a chegada no laboratório foram submetidos a avaliações clínicas e do histórico médico, além de um período de adaptação (30 dias). Posteriormente, foram alocados em mini-isoladores de polisulfona (1154cm² área piso), com lotação máxima de quatro (4) animais, no sistema de estante ventilada (rack) face dupla (Figura 5).

O sistema utilizado promove uma maior eficiência na troca de ar (insuflação e exaustão) dos mini-isoladores, fazendo a injeção de ar filtrado e a remoção da umidade excessiva e dos principais gases tóxicos sistêmicos (amônia e CO₂). Além disso, o sistema ainda impede a contaminação cruzada, dispersão de alergênicos e promove bloqueio de ruídos e odores (Alesco, 2020). Durante todo o período experimental foram utilizadas as configurações para 40 trocas de ar dos mini-isoladores a cada 60 minutos.

Os animais foram mantidos sob ambiente controlado, com temperatura constante (22±2°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6–18 horas). A água foi filtrada e fornecida *ad libitum* através de bebedouro de polisulfona (700 ml), com bico de aço inoxidável em modelo deitado. A ração comercial peletizada Labina

Presence® foi fornecida de acordo com as instruções do fabricante, sendo 12 a 30g/animal/dia.



Figura 5. Rack ventilado Série Ventilife e mini-isoladores de polisulfona (1154cm² área piso). Imagem do fabricante: Alesco, 2020.

3.3 Delineamento experimental

Este estudo tem caráter prospectivo longitudinal e foi delineado em paralelo de forma randomizada e placebo-controlada. Os animais foram distribuídos em quatro (4) grupos com 50 indivíduos cada: machos tratados com placebo (MP), machos tratados com nitrato inorgânico (MT), fêmeas tratadas com placebo (FP) e fêmeas tratadas com nitrato inorgânico (FT). A intervenção neste trabalho objetiva o fornecimento adicional, de forma crônica, de nitrato inorgânico por via oral, a partir de uma idade pré-estabelecida (15 meses) até a morte natural dos indivíduos.

Para os grupos tratados com nitrato, o fornecimento *ad libitum* de água foi substituído por uma solução tratamento de nitrato inorgânico (10mM), feita pela adição de 0,85mg/L de nitrato de sódio (NaNO₃ - Sigma-Aldrich n°221341) à água filtrada de beber. Para os grupos controles foi ofertada água filtrada da

mesma fonte sem aditivos, também de modo *ad libitum*. As soluções tratamento e controle foram trocadas a cada 48 horas e não houve alterações no fornecimento de ração.

Diversas pesquisas demonstram que a suplementação na dose de 10mM de nitrato inorgânico na água de beber foi relacionada com efeitos benéficos a curto prazo (Gao et al., 2014; Guimarães et al., 2019; Cordero-Herrera et al., 2020). Do mesmo modo, o efeito positivo do consumo de nitratos sobre a saúde e a progressão de doenças já foi descrito pelo nosso grupo de pesquisa em várias outras dosagens, vias e modelos experimentais, como revisado por Lundberg e colaboradores (2018). Entretanto, não existem avaliações para o consumo crônico de nitrato inorgânico e seus efeitos sobre a longevidade e envelhecimento, em modelos experimentais com animais vertebrados.

3.4 Acompanhamento clínico

A partir do início das intervenções com nitrato e placebo (15 meses de idade), os animais foram acompanhados semanalmente até a morte natural. Dessa forma, a cada sete (7) dias foi realizada avaliação clínica, bem como a avaliação do consumo de água, estado mental, presença de distúrbios locomotores, alterações dermatológicas, dentárias e neoplásicas. Ademais, a morte natural dos animais por senescência foi monitorada e registrada (tempo de vida).

Por se tratar de um acompanhamento observacional, nenhuma intervenção de cunho clínico ou tratamento concomitante foram realizados. No entanto, nos casos de detecção de quaisquer sinais de dor e sofrimento, os animais foram prontamente eutanasiados com a associação de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (75mg/kg) por via intraperitoneal, com adição de metodologia complementar (exsanguinação), como preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2019).

3.5 Avaliações bioquímicas periódicas

Com periodicidade de três (3) meses, a partir do início das intervenções, os animais foram submetidos a avaliações laboratoriais para determinação do

estresse oxidativo, função renal, hepática e perfil lipídico a partir de amostras de soro.

Para a coleta de sangue, os animais foram retirados individualmente dos mini-isoladores, posicionados em bancada limpa e em seguida alocados em contêntores de acrílico específicos de acordo com o tamanho. Após a contenção física e a higienização da cauda com álcool 70%, seringas (3ml) e agulhas (0,3x13mm) descartáveis foram utilizadas para punção e coleta de aproximadamente 1 ml de sangue da veia lateral da cauda. Volume sanguíneo colhido está de acordo com o recomendado pelo CONCEA (2019), que preconiza a coleta máxima de 10% do volume circulante.

Após a coleta, as amostras foram colocadas em tubos de Eppendorf (2ml) e submetidas à centrifugação a 3000rpm por 10 minutos para separação do soro. Em seguida, foram armazenadas (-20°C) até a avaliação bioquímica em no máximo sete (7) dias.

3.5.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é comumente estimado pela quantificação de produtos produzidos pelos danos causados pela oxidação. Nesse sentido, foi proposto por Ohkawa e colaboradores (1979) a análise do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, por meio de reações com o ácido tiobarbitúrico (ensaio TBARS).

Para a execução do ensaio TBARS, o soro congelado após a coleta foi mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, uma alíquota de 250 µl foi separada e submetida ao banho seco a 37°C por 1 hora. Em seguida, 400 µl de ácido perclórico foi adicionado e a mistura centrifugada a 14000 rpm durante 20 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi removido, misturado com 400 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado a 100 °C por 1 hora. Após o retorno a temperatura ambiente, a absorbância da amostra foi mensurada em 532 nm em espectrofotômetro e os resultados foram tabelados e expressos como nmol de MDA/ml de soro.

3.5.2 Avaliação hepática, renal e lipídica

As avaliações bioquímicas foram realizadas a partir dos kits comerciais da marca Bioclin® (Minas Gerais, Brasil). Para a avaliação hepática, foram utilizados kits para dosagem sérica das enzimas de extravasamento alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) e das enzimas de indução, gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA). A avaliação renal, por sua vez, foi realizada por meio da dosagem dos principais biomarcadores séricos da função glomerular renal, ureia e creatinina. E o perfil lipídico, avaliado por meio da dosagem do colesterol total e os níveis séricos das lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Após a execução dos protocolos específicos para cada componente, as amostras foram submetidas à mensuração da absorbância em espectrometria (Analisador Automático ChemWell-T). Os valores observados foram aplicados em fórmulas de correção específica para cálculo das quantidades séricas de cada parâmetro avaliado (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos componentes da avaliação bioquímica e metodologia utilizada. Informações do fabricante Bioclin® (Minas Gerais, Brasil).

Perfil avaliado	Componente	Unidade	Metodologia	Comprimento de onda
Hepático	ALT	U/L	Cinética (UV)	340 nm
Hepático	AST	U/L	Cinética (UV)	340 nm
Hepático	FA	U/L	Cinética IFCC	405 nm
Hepático	GGT	U/L	Cinética IFCC	405 nm
Renal	Ureia	mg/dL	Cinética em tempo fixo	340 nm
Renal	Creatinina	mg/dL	Cinética colorimétrica	510 nm
Lipídico	Colesterol total	mg/dL	Enzimática Colorimétrica	550 nm
Lipídico	HDL	mg/dL	Enzimática colorimétrica	500 nm

3.6 Reatividade Vascular

De modo a normalizar a avaliação, apenas animais que receberam as intervenções com nitrato e placebo por mais de 12 meses e até 18 meses foram utilizados para análise da reatividade vascular. Assim, nos casos onde houve detecção de quaisquer sinais de dor e sofrimento, os animais dessa faixa de idade (27 a 33 meses) foram imediatamente eutanasiados. Após a eutanásia, realizou-se uma incisão única na linha alba para acesso à cavidade abdominal. Feito isso, a artéria mesentérica cranial foi identificada, removida e incubada em solução Tyrode de imediato.

Todos os reagentes e sais utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich® e a composição da solução fisiológica Tyrode está representada na tabela abaixo:

Tabela 2: Composição da solução fisiológica Tyrode em mM (TANAKA et al.,1999).

SAL	CONCENTRAÇÃO (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
MgCl ₂	1,05
NaHCO ₃	10,0
NaH ₂ PO ₄	0,42
C ₆ H ₁₂ O ₆	5,6

Em seguida, a artéria foi dissecada e seccionada em anéis com 1-2 mm de comprimento. Os anéis foram imersos em cubas (10ml) e suspensos verticalmente, por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (PowerLab™, ADInstruments, MA, EUA). Os tecidos foram mantidos em Tyrode, a 37° C, gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio), com pH constante entre 7,2 e 7,4. Os anéis foram, então, submetidos a uma tensão basal de aproximadamente 0,75 g, por um período de 60 min. Durante este período, a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos, e a tensão basal foi ajustada quando necessário (ALTURA, ALTURA,1970).

Mudanças na tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição CVMS (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA). Após o período de estabilização de 60 minutos, foi realizado o teste de avaliação da integridade endotelial dos vasos. Para isso, inicialmente induziu-se a contração do anel com fenilefrina (FEN 10 μ M), um agonista α -adrenérgico; foram considerados viáveis os anéis que obtiverem uma contração superior a 0,30g. A presença do endotélio funcional foi verificada pelo relaxamento dos anéis após adição de acetilcolina (ACh, 10 μ M), um agonista dos receptores muscarínicos. Foram considerados com endotélio funcional os anéis com relaxamento superior a 60% sobre pré-contração com fenilefrina. Vale ressaltar ainda que, por se tratar de animais idosos, este é um valor consideravelmente menor do que o estipulado comumente (80%), como discutido por Matz e colaboradores (2000). Ademais, quando o relaxamento foi inferior a 60% e superior a 10%, os anéis foram descartados, e foram considerados sem endotélio quando o relaxamento foi inferior a 10%.

Após o teste de viabilidade endotelial foi realizada a avaliação da resposta contrátil dos anéis à fenilefrina (FEN) por meio da adição ao banho de concentrações crescentes de maneira cumulativa de FEN (0,1 nM – 10 μ M) com intervalos de 3 minutos, de modo a compor uma curva concentração-resposta do efeito constritor da droga. Em seguida, após as lavagens e o período de estabilização, a avaliação do relaxamento dos anéis foi avaliada.

Para a avaliação do relaxamento se fez necessária a contração dos anéis com FEN (10 μ M) e, a partir do tônus dessa contração, concentrações cumulativas e crescentes de nitroprussiato NPS (0,1 nM – 10 μ M) foram adicionadas ao banho, com intervalos de três minutos entre cada concentração, para os anéis que indicaram ausência de endotélio no teste realizado previamente. Já nos anéis que indicaram presença de endotélio funcional após a contração com FEN, concentrações cumulativas e crescentes de ACh (0,1 nM – 10 μ M) foram adicionadas ao banho, também com intervalos de três minutos entre cada concentração. Dessa forma, as respostas obtidas após a adição de NPS (E-) e ACh (E+) foram utilizadas para a obtenção das curvas concentração-resposta.

3.7 Avaliação Histopatológica

Em caso de óbito por senescência ou eutanásia (vide 3.4), foi realizada a necropsia com fotodocumentação do animal, seguida pela avaliação clínica dos demais indivíduos que compartilhavam o mesmo mini-isolador.

Durante as necropsias, todos os sistemas orgânicos foram avaliados macroscopicamente, e amostras de rim, coração, fígado, cérebro, cerebelo e intestinos foram coletados para a confecção de lâminas e avaliação histopatológica. Vale ressaltar que em casos de alterações macroscópicas em outros órgãos, fragmentos também foram coletados e analisados.

A coleta das amostras foi realizada por meio da remoção de 1-2 cm² do tecido fresco e incubação em solução de formol 10% para fixação, onde permaneceram por no máximo 3 meses até a confecção das lâminas utilizando o protocolo adaptado de Carvalho e colaboradores (2019).

O início do processamento histológico foi realizado pela inclusão das amostras em parafina. Inicialmente, os tecidos foram desidratados utilizando álcool etílico em concentrações crescentes (70% - 90% - 95% - 100%), diafinizados pelo xilol e impregnados em parafina líquida na estufa (60°C). Em seguida, foram incluídos em blocos uniformes de parafina, para que os cortes transversais usando o micrótomo (espessura padrão - 5µm) pudessem ser realizados. Por fim, as amostras já distribuídas nas lâminas de vidro foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE) para posterior montagem e análise histopatológica em microscopia de luz.

Após a coloração e secagem, as lâminas foram digitalizadas e avaliadas por profissionais especializados do Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário (HV/CCA/UFPB), com o objetivo de identificar a *causa mortis*.

3.8 Análise Estatística

O tempo de vida total dos animais foi utilizado para compor as curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier), que foram analisadas pelo teste estatístico de Mantel-Cox (Log-rank) e teste “t” de Student.

Os resultados do consumo de água, tempo de vida e análises bioquímicas foram expressos como média ± desvio padrão da média. A comparação foi

realizada pelo teste ANOVA (One-Way) seguido pelo pós-teste de Tukey. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Para a avaliação da reatividade vascular, as curvas concentração-resposta, os valores de E_{max} (Efeito máximo) e o pD_2 (logaritmo negativo da concentração que produz 50% do E_{max}) foram obtidos por regressão não-linear.

Os dados foram analisados e plotados em gráficos por meio do programa GraphPad Prism versão 6.0.

Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo de água e nitrato inorgânico (NaNO_3)

A manutenção do volume e da osmolaridade dos fluidos corporais, assim como adequadas respostas adaptativas aos possíveis estresses osmóticos do decorrer da vida, são medidas cruciais para a sobrevivência das espécies. No entanto, a longo prazo, o processo de envelhecimento é responsável por alterações significativas nos mecanismos fisiológicos do balanço hidroeletrólítico, além de uma redução considerável na proporção de fluidos no organismo (Humanos: recém-nascidos = 70% / idosos = 50%)(Hooper et al., 2014).

Em indivíduos idosos, estudos demonstram variações na ingestão de água diária, bem como uma maior osmolaridade plasmática, diminuição da percepção da sede (aumento da saciedade) e redução da sensibilidade dos barorreceptores (Begg et al., 2017). Tais achados, somados ao efeito do tempo sobre a capacidade de conservar água e concentrar a urina dos rins, fazem com que haja um aumento do risco de desidratação da população idosa (Hooper, 2016).

Ademais, o envelhecimento também está relacionado com uma redução significativa das reservas de fluido do organismo. O tecido muscular (70% de água) e o tecido adiposo (10-40% de água) são exemplos onde a redução gradativa da massa tecidual leva a um esgotamento mais rápido das reservas de água em animais longevos (Hooper et al., 2014).

Nesse âmbito, a hipovolemia é o principal estímulo para a liberação de renina pelos rins e, conseqüentemente, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Nesse sistema, a angiotensina II (ANGII) pode atuar de forma central, estimulando a sede, o apetite ao sódio e a liberação de vasopressina no cérebro (órgãos circunventriculares, lâmina terminal e áreas límbicas) (Yoon; Choi, 2014; Nakagawa et al. 2020).

A ANGII ainda apresenta efeitos periféricos, como potente substância vasoconstritora e principal estimuladora da liberação de aldosterona pela glândula adrenal, que por sua vez reduz a perda de sódio na urina e estimula a ingestão de sal. Entretanto, estudos demonstram que com o envelhecimento há

uma redução gradativa da atividade do SRAA em diversos níveis e, por conseguinte, uma maior predisposição a distúrbios no equilíbrio hidroeletrólítico (Yoon; Choi, 2014; Cognuck et al., 2020; Nakagawa et al. 2020).

Além das alterações diretas do envelhecimento, as diferenças entre machos e fêmeas também refletem sobre as respostas fisiológicas e comportamentais do balanço de sal e água do organismo. Os efeitos são principalmente mediados pelos hormônios sexuais: testosterona para os machos e estrógeno para as fêmeas (Xue et al., 2013; Santollo et al., 2017).

Ainda referente ao efeito do sexo, as fêmeas apresentam maiores respostas dipsogênicas (maior consumo de água), frente a diferentes estímulos osmóticos e de volume, além de apresentarem maior preferência por soluções salinas do que os machos de mesma idade (Santollo et al., 2017). Cognuck e colaboradores (2020), demonstram diferenças significativas entre os sexos no consumo de sal e água diante da privação de líquidos, além de variações em diversos hormônios envolvidos na sua regulação, como ANGII, vasopressina, ocitocina e corticosterona.

No presente trabalho, a avaliação do consumo diário de água foi realizada a cada três meses a partir do início das intervenções (15 meses de idade), no entanto, não foram observadas alterações significativas relacionadas à passagem do tempo, em nenhum dos grupos. Tal observação é similar ao encontrado por Cognuck e colaboradores (2020), onde demonstram que, em condições normais, os animais com 18 meses de idade consomem a mesma quantidade de água e solução salina do que animais com 3 meses de idade. Entretanto, os autores ressaltam que o envelhecimento é responsável por alterações nos mecanismos compensatórios diante de situações de estresse osmótico (privação de água).

Sobre a avaliação do consumo de fluidos em modelos animais, cabe destacar que todos os dados utilizados para a avaliação do consumo de água neste trabalho foram normalizados pelo peso corporal e expressos na forma do consumo diário em mililitros (ml) a cada 100g de peso vivo. Tal discussão e metodologia foram propostos por Santollo e colaboradores (2017), que descrevem variações dos resultados de acordo com o peso corporal dos indivíduos, sobretudo nas avaliações entre machos e fêmeas, e reforçam a importância da normalização para análise dos dados.

Dessa forma, outro ponto avaliado neste trabalho foi o efeito do sexo sobre o consumo diário de água. A priori, os animais do sexo masculino apresentaram um consumo individual maior de água, no entanto, os mesmos apresentaram peso corporal quase duas vezes maior que as fêmeas (machos = $494,3 \pm 99,3$ g / fêmeas = $268,6 \pm 41,7$ g). Sendo assim, após a normalização dos resultados pelo peso corporal (Santollo et al., 2017), foi possível observar que as fêmeas apresentam um consumo diário maior de água ($13,42 \pm 0,18$), quando comparadas aos machos ($11,19 \pm 0,33$) (Figura 6A).

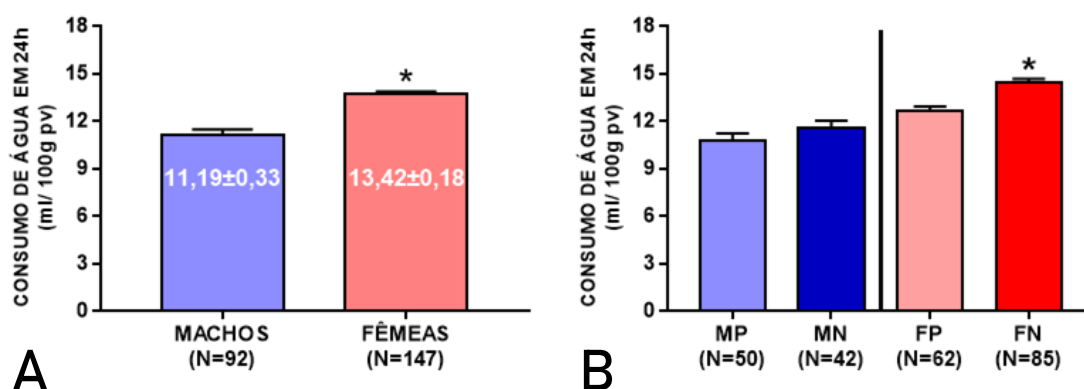


Figura 6. Avaliação do consumo diário de água suplementada ou não com nitrato inorgânico (10mM), em animais idosos de ambos os sexos. (A) Avaliação do efeito do sexo, consumo de fêmeas e machos (ambos os grupos). (B) Avaliação do efeito das intervenções por grupo experimental. Valores normalizados pelo peso corporal (mililitro / 100g peso vivo), onde * $p < 0,05$.

Nesse aspecto, é sabido que os hormônios sexuais femininos têm efeitos sobre o balanço hidroeletrolítico e na fisiologia da ativação do SRAA. Além disso, diversos estudos já demonstram que além do maior comportamento dipsogênico, as respostas aos diferentes estímulos osmóticos e de volume são mais evidentes em fêmeas do que em machos (Santollo; Daniels, 2015; Santollo et al., 2018).

Ainda no tocante ao efeito do sexo sobre o balanço hidroeletrolítico, pesquisas descrevem que as fêmeas apresentam maior apetite ao sal quando comparadas aos machos, tanto em animais jovens (Santollo et al., 2017), quanto idosos (Cognuck et al., 2020). Achados que corroboram com os resultados deste trabalho, onde, ao dissociar os grupos experimentais, foi possível identificar que não existem diferenças no consumo de água para os animais machos que

consumiram nitrato e solução placebo. No entanto, para as fêmeas, há um maior consumo de solução contendo sal, na forma de nitrato de sódio (NaNO_3 10mM), do que a solução placebo (Figura 6B).

O registro e avaliação do consumo de fluidos permitem ainda estimar a quantidade aproximada de nitrato de sódio ingerida diariamente pelos animais, neste trabalho. Dessa forma, com base nos resultados da ingestão hídrica (*ad libitum*) dos indivíduos tratados com nitrato (Figura 6B) e a concentração da solução (NaNO_3 10mM), foi possível estimar que os animais do sexo masculino consumiram individualmente, em média $51,2 \pm 13,1$ mg, e as fêmeas, $33,4 \pm 6,4$ mg de nitrato de sódio por dia.

Levando em consideração as correções pelo peso corporal (Santollo et al., 2017), cabe destacar a inversão dos resultados e o maior consumo de nitrato para os animais do sexo feminino, sendo de aproximadamente 12,4 mg a cada 100g de peso vivo por dia. Já nos animais do sexo masculino, o consumo aproximado foi de 9,79 mg de nitrato, também a cada 100g de peso vivo por dia.

Estudos demonstraram que a suplementação na água de beber com nitrato de sódio na concentração de 10mM durante 10 dias (Gao et al., 2015) e 14 dias (Guimarães et al., 2019) foi responsável pelo aumento significativo (quase três vezes maior) das concentrações de nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2), tanto no plasma quanto no líquido cefalorraquidiano. Esses resultados validam a eficiência da via nitrato-nitrito-óxido nítrico a partir do consumo dietético de nitrato de sódio nesta concentração.

Em paralelo com a ingestão e suplementação natural em humanos, o consumo de nitratos inorgânicos apresenta variações consideráveis de acordo com os hábitos alimentares. Além de serem componentes naturais encontrados em vegetais de folhas verdes escuras, os nitratos também são utilizados como aditivos em alimentos processados e afetam positivamente a aparência, o sabor, a segurança e a qualidade dos produtos, especialmente de carnes curadas (Bedale et al., 2016).

Roila e colaboradores (2018), avaliaram a concentração de nitrato e nitrito em diferentes vegetais e carnes curadas comuns na dieta de indivíduos na Itália. No trabalho, os autores descrevem que os vegetais com maiores concentrações de nitrato são: rúcula (4415mg/kg), rabanete (3817mg/kg) e espinafre (2036mg/kg). Entre as carnes, as concentrações são muito menores quando

comparadas aos vegetais, no entanto, destaca-se a “Bresaola”, carne bovina seca envelhecida por dois ou três meses (188mg/kg), e o bacon suíno (178mg/kg).

Além do consumo de alimentos, os nitratos também podem ser ingeridos através da água de beber. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), o nível máximo de nitrato em abastecimento público de água potável é de 50mg/L. Contudo, cada país pode adotar adaptações das diretrizes preconizadas, como por exemplo, nos Estados Unidos onde o máximo permitido é de 10mg/L (Ward et al., 2018).

Diante do exposto, a suplementação crônica com nitrato inorgânico não foi responsável por desenvolver alterações no equilíbrio hidroeletrolítico de animais idosos, além de preservar as características inerentes ao sexo, no tocante ao consumo diário de sal e água. Nesse aspecto, o consumo crônico de nitrato pela população idosa parece seguro, todavia, mais estudos que avaliem seu custo-benefício são necessários.

4.2 Tempo de vida e curvas de sobrevivência

A longevidade e o envelhecimento, em especial o envelhecimento saudável, estão entre os fenótipos mais complexos estudados atualmente. A análise do tempo de vida total dos indivíduos e suas variações ao longo da evolução das espécies é um dos principais parâmetros para o estudo desses fenótipos (Singh et al., 2019). Assim, estima-se que o tempo de vida útil seja determinado por fatores genéticos (apenas 25%) e fatores pós-genéticos, como o estilo de vida, hábitos alimentares e a influência do ambiente a qual o organismo está inserido (Brooks-Wilson, 2013).

A respeito dos mecanismos regulatórios do tempo de vida, estudos recentes descrevem que os organismos complexos detêm sistemas genéticos de regulação espécie-específicos para eventos do início da vida, como o controle do desenvolvimento, crescimento e reprodução. Esses sistemas têm como objetivo impor limites e restrições funcionais do organismo e, dessa forma, acabam por determinar a progressão da vida e a longevidade dos indivíduos. Assim, por parecem promover um “limite natural” à vida, tais mecanismos são alvos de extensas pesquisas que objetivam, através de manipulação genética ou

farmacológica, flexibilizar e estender a duração da vida das espécies (Baati et al., 2012; Dong et al., 2016).

Ainda sobre tais pesquisas, por questões que envolvem desde as similaridades fisiológicas até o custo envolvido, a maioria dos estudos envolvendo ciências biológicas e da saúde utilizam modelos murinos (Dutta; Sengupta, 2016). Quanto aos estudos de longevidade e envelhecimento, mesmo havendo uma diferença relevante entre o tempo máximo de vida, os murinos ainda compõem os principais modelos para estudos translacionais nesta temática, pois além do custo-benefício favorável, também apresentam similaridades significativas no processo metabólico e nos mecanismos moleculares que determinam o envelhecimento (Demetrius; 2006; Dutta; Sengupta, 2016).

A expectativa de vida de ratos de laboratórios utilizados em modelos experimentais é de 2,5 a 3,5 anos, com média de 3 anos. Em paralelo com a expectativa de vida humana (~70 anos), 1 ano para os humanos equivale a 2 semanas (13,4 dias) na expectativa de vida desses animais. Tais dados norteiam a possibilidade de translação dos estudos sobre envelhecimento e longevidade, principalmente aqueles que envolvem o possível aumento ou diminuição do tempo de vida dos indivíduos (Andreollo et al., 2012; Sengupta, 2013).

O presente trabalho avaliou continuamente os efeitos do consumo de nitrato inorgânico sobre a longevidade e o envelhecimento de ratos Wistar machos e fêmeas idosos. Os animais foram monitorados a partir do início das intervenções, e os dados do tempo de vida total dos indivíduos foram obtidos a partir da contagem total de dias entre as datas de nascimento e óbito.

Dessa forma, a partir dos valores combinados de machos e fêmeas, foi possível obter uma média de $886,7 \pm 168,2$ dias de vida para o grupo placebo e $862,6 \pm 185,3$ dias para o grupo que consumiu nitrato inorgânico a partir dos 15 meses de idade. Tais valores não apresentam significância estatística a partir do teste-t pareado (Figura 7A).

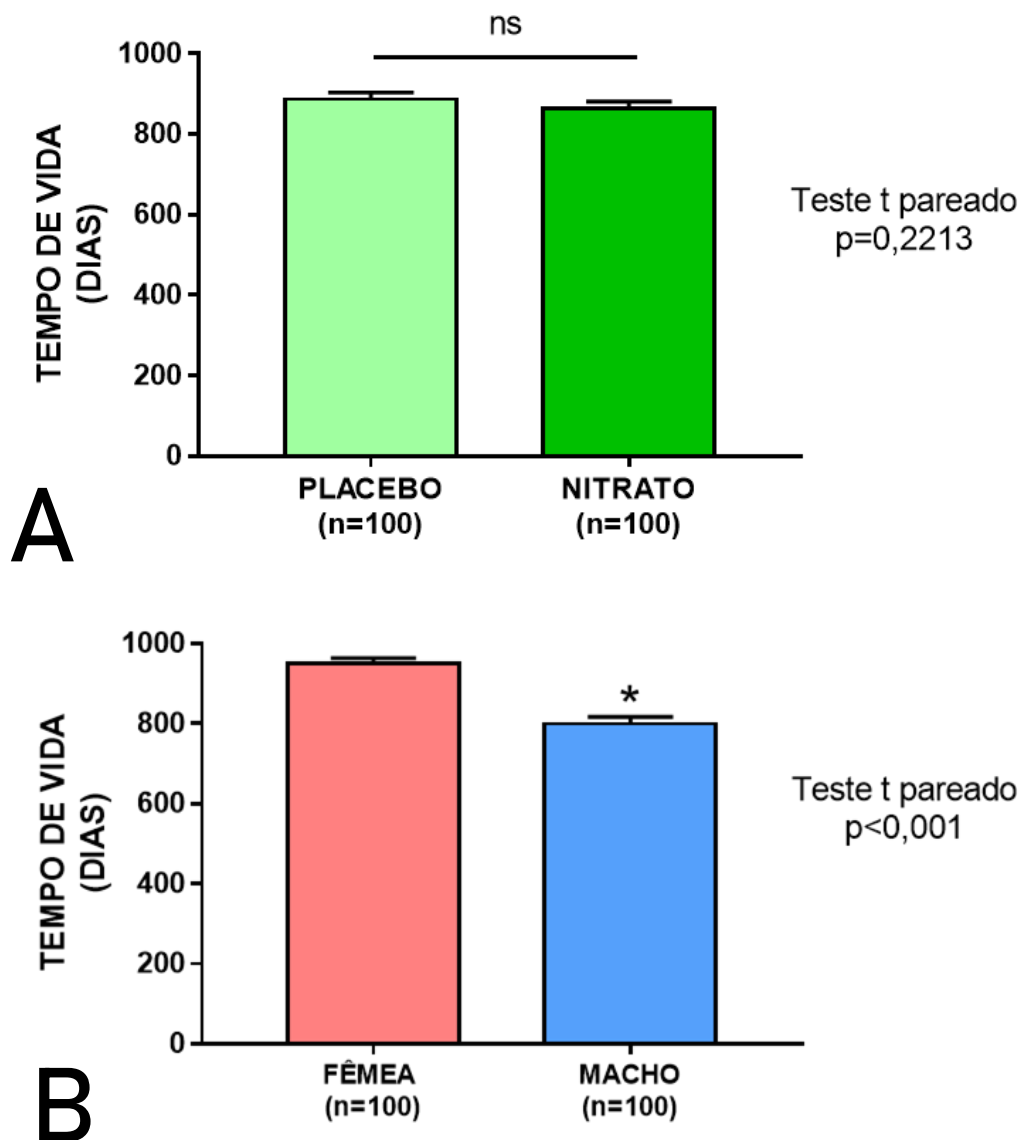


Figura 7. Tempo total de dias de vida de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo. (A) Efeito do tratamento sobre o tempo de vida (gêneros combinados). (B) Efeito do sexo sobre o tempo de vida (intervenções combinadas).

No entanto, ao isolar o fator sexo (combinando os grupos placebo e nitrato), foi possível identificar um tempo de vida maior (aproximadamente 15,4%) nas fêmeas ($950,0 \pm 138,9$ dias) quando comparados aos machos ($799,4 \pm 179,4$ dias), valores que foram significativamente diferentes (Figura 7B). Tais dados ratificam o encontrado na literatura, onde as fêmeas apresentam maior expectativa de vida em diversos modelos animais, inclusive em humanos (Austad; Fischer; 2016; Davis et al., 2018).

Ainda no que se refere aos efeitos do nitrato, os grupos foram dissociados e comparados de acordo com o sexo (Figura 8). Quanto as fêmeas, o grupo que recebeu a solução placebo obteve uma média de $951,0 \pm 150,1$ dias de vida, enquanto o grupo suplementado com nitrato inorgânico teve média de $949 \pm 128,2$ dias de vida, dados que não apresentam diferença considerável a partir do teste t pareado ($p=0,9405$) (Figura 8A).

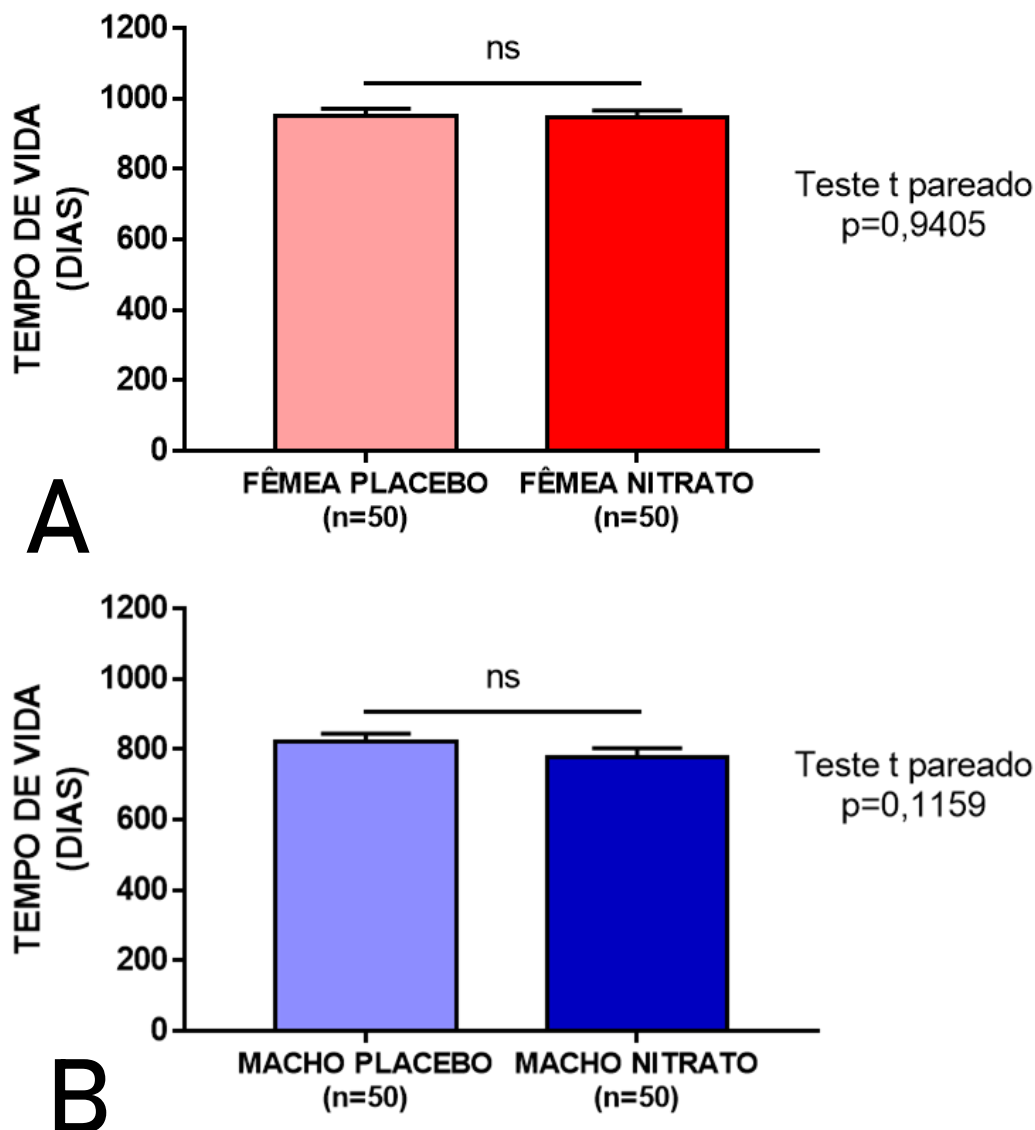


Figura 8. Tempo total de dias de vida de fêmeas (A) e machos (B) tratados com nitrato inorgânico por via oral a partir dos 15 meses de idade e solução placebo. Os valores foram comparados utilizando o teste-t pareado.

Quanto aos machos, os resultados também não apresentaram diferenças em relação ao tratamento ($p=0,1159$). Os machos placebo obtiveram uma média

de $822,5 \pm 161,9$ dias de vida, e os machos tratados com nitrato inorgânico, tempo de vida médio de $776,2 \pm 194,1$ dias (Figura 8B).

Tais dados sugerem que, a priori, o consumo crônico de nitrato não exerce nenhuma influência sobre o tempo de vida e a longevidade dos indivíduos, independente do sexo. No entanto, cabe ressaltar que o tempo total de vida é apenas uma variável e faz parte das metodologias “clássicas” de análise estatística, com considerações quanto aos seus métodos em estudos a longo prazo. Neste cenário, as análises de sobrevivência, uma categoria estatística específica, se faz mais adequada (Schober; Vetter, 2018).

De acordo com Botelho e colaboradores (2009), as análises clássicas não utilizam dados “incompletos”, ou seja, as amostras que não atingiram o tempo total previsto, são censuradas. Situação comum nos casos onde há perda de dados durante a fase de coleta, desistência, morte dos animais experimentais, entre outras intercorrências.

Já em uma análise de sobrevivência, todos os dados podem ser utilizados até o momento onde houve a interrupção da coleta, característica que classificam esses métodos como ideais para diversos modelos experimentais, como: (1) os estudos com respostas binárias (desenvolver ou não um evento X), (2) delineamentos longitudinais — que se caracterizam por um longo período de coleta, (3) estudos com períodos diferentes de análises entre os indivíduos, e (4) aqueles com variações significativas na quantidade de unidades amostrais pelo tempo. Dessa forma, as análises de sobrevivência são as mais utilizadas em estudos sobre longevidade e envelhecimento, que apresentam na maioria das vezes todas as considerações supracitadas (Davis et al., 2018).

Além do exposto, por serem calculadas ponto-a-ponto e de forma contínua, as análises de sobrevivência avaliam a rapidez com que os participantes desenvolvem determinado evento (desfecho). Ou seja, é possível avaliar o risco e ritmo que os eventos se expressam nos diferentes grupos. Diferente da forma clássica, que avalia o resultado final dos eventos em um período determinado, por exemplo, as percentagens de pessoas doentes e não-doentes em um ano (George et al., 2014).

Assim, temos que a análise dos dados de sobrevivência é única, pois o interesse da pesquisa é tipicamente uma combinação de ocorrência ou não do evento (resultado binário) e quando ocorreu (resultado contínuo). Tais dados são

obtidos a partir de técnicas estatísticas específicas e apresentam características individuais de análise e interpretação (Botelho et al., 2009). A comparação das técnicas utilizadas nos diferentes tipos de análise foi expressa na Tabela 3.

Levando em consideração a literatura específica e as características inerentes a esta pesquisa — como as diferenças nas datas de início de tratamento e a possibilidade de óbito a qualquer momento (delineamento “end-of-life”) —, as técnicas de sobrevivência são essenciais para a análise da presença dos efeitos causados pelo consumo crônico de nitrato inorgânico, o tempo necessário para sua expressão e a diferença entre os sexos. As ferramentas estatísticas utilizadas nesta pesquisa foram baseadas no modelo utilizado por Davis e colaboradores (2018), que descreve o aumento do tempo de vida relacionado com o sexo genético da fêmea (XX) em comparação aos machos (XY) sobre o tempo de vida, utilizando animais transgênicos com sexo gonadal invertido (XX com testículos e XY com ovários).

Tabela 3: Comparação entre as técnicas estatísticas utilizadas nas análises convencionais “clássicas” e nas análises de sobrevivência. Adaptado de Botelho e colaboradores (2009).

	Análise “clássica”	Análise de sobrevivência
Organização dos resultados	Tabela convencional	Tabela de sobrevida
Apresentação dos resultados	Gráfico de barras, histograma	Curva de Kaplan-Meier
Medidas de associação	Risco relativo, <i>Odds ratio</i>	<i>Hazard ratio</i>
Testes de significância (Análise univariada)	Teste t-student, ANOVA, Teste X ²	Teste de log-rank
Testes de significância (Análise multivariada)	Regressão multivariada	Regressão de COX (Cox Proportional Hazards Models)

Os dados colhidos durante o período de acompanhamento clínico dos grupos experimentais foram utilizados para construção das tabelas de sobrevida e as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, enquanto os grupos foram comparados pelo teste de log-rank e o risco estimado pelo *Hazard ratio* (HR). Tais curvas dividem o tempo de seguimento em intervalos cujos limites correspondem a data exata do evento, sendo, portanto, mais preciso. Neste trabalho, o evento determinante para a análise e construção das curvas é o óbito dos animais por via natural ou eutanásia.

Primeiramente, foi analisada a influência da intervenção sobre a sobrevivência, através da combinação dos dados de ambos os sexos. Dessa forma, é possível avaliar que as curvas se sobrepõem, e ao analisar os resultados ponto-a-ponto, não existem diferenças relevantes entre os grupos tratados com nitrato inorgânico e placebo (Figura 9). Tais resultados corroboram os valores do tempo de vida total mostrados anteriormente.

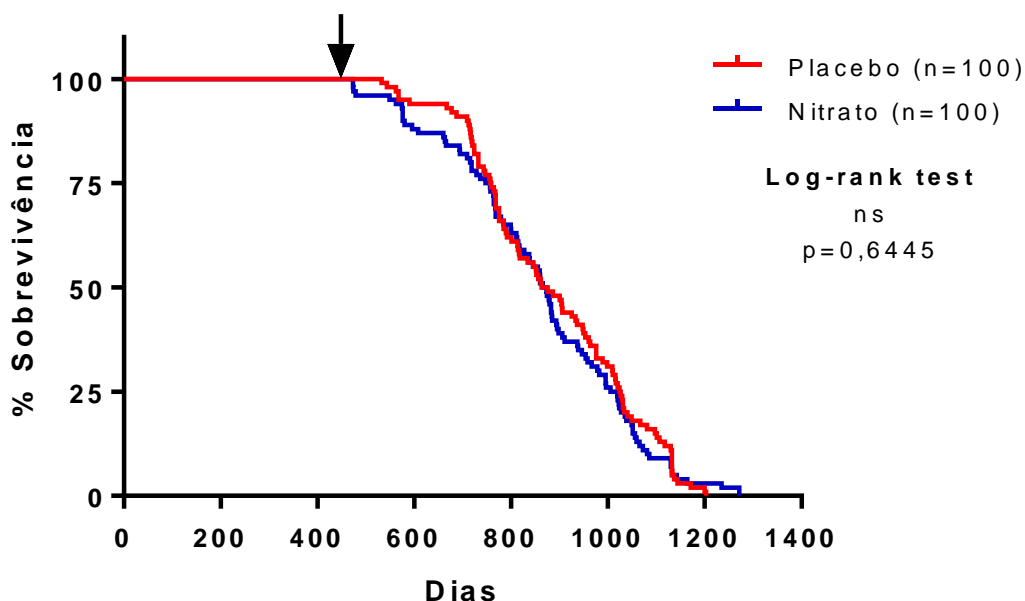


Figura 9. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparação entre os grupos pelo teste de log-rank (dados de gênero combinados). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Início do tratamento aos 15 meses de idade (seta preta).

Ao analisar as curvas de sobrevivência Kaplan-Meier mediante os efeitos do gênero sobre o tratamento com nitrato inorgânico, também não foi possível identificar diferenças estatísticas no teste de log-rank (Figura 10). As curvas de sobrevivências das fêmeas apresentaram áreas de sobreposição e interseção, estatisticamente iguais entre si ($p=0,4624$). Além disso, em ambos os grupos, as primeiras mortes foram identificadas a partir dos 670 dias de vida, aproximadamente 7 meses após o início das intervenções (Figura 10A).

Os resultados foram similares aos encontrados nos machos, onde não foram evidenciadas alterações quanto ao consumo de nitrato inorgânico e solução placebo ($p=0,5489$). Entretanto, cabe destacar o desvio à esquerda das

curvas de machos quando comparado às fêmeas, ratificando o apresentado na Figura 7B, onde o tempo de vida total foi consideravelmente menor nos machos. Além disso, as primeiras mortes foram relatadas após menos de 2 meses do início das intervenções, sobretudo nos animais que consumiram nitrato (aproximadamente 8%), valores muito abaixo da expectativa de vida da espécie (Figura 10B).

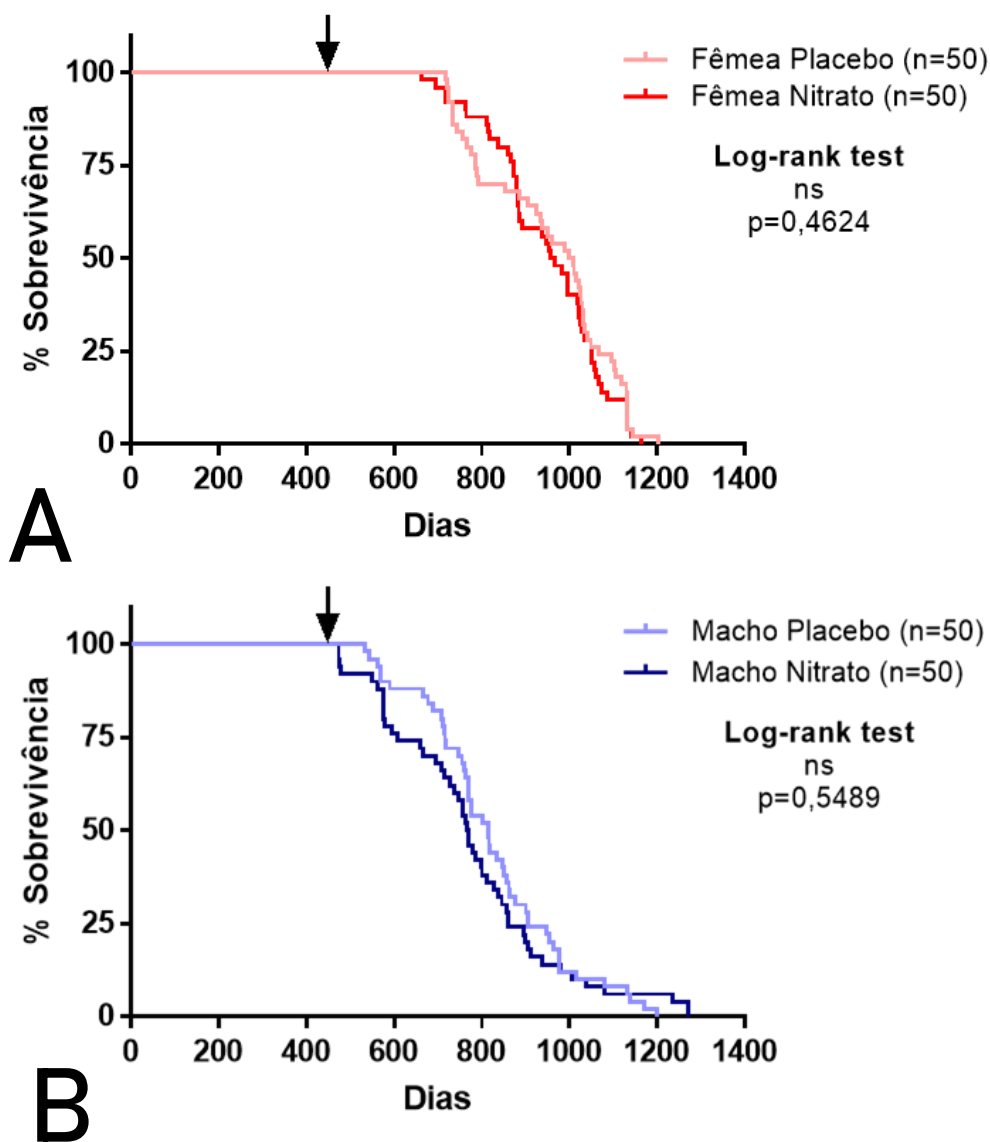


Figura 10. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e comparação ponto-a-ponto pelo teste de Log-rank. Efeito do consumo de nitrato inorgânico e solução placebo em fêmeas (A) e machos (B). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Início do tratamento aos 15 meses de idade (seta preta).

Ao comparar o efeito do sexo, as fêmeas apresentam dados de sobrevivência melhores, além de não apresentarem episódios de mortes precoces e um tempo de vida médio maior (15,4%). Comparando fêmeas que consumiram nitrato com machos que também consumiram nitrato inorgânico, os resultados se repetem: os efeitos do consumo de nitrato foram mais expressivos em fêmeas ($p=0,0008$).

Ainda sobre as análises de sobrevivência, para dimensionar o efeito entre os grupos experimentais foi utilizada uma medida de associação chamada *Hazard ratio* (HR), com interpretação semelhante ao risco relativo (Tabela 4). O Hazard é a probabilidade de ocorrência de um evento em função do tempo. Neste trabalho, o evento norteador é a morte, ou seja, o Hazard do grupo é a probabilidade de algum animal vir a óbito em determinado ponto da curva. Sendo assim, a razão entre os Hazard (*Hazard ratio*) dos grupos compara a incidência instantânea com que os eventos ocorrem nos diferentes grupos. Dessa forma, é possível analisar se o tratamento (e/ou o sexo) aumenta ou diminui o risco de morte entre os grupos experimentais (Miot, 2017). Os dados da análise do HR foram descritos na Tabela 4.

Tabela 4: *Hazard ratio* e intervalo de confiança (95% CI) obtido a partir da análise das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os grupos experimentais (nitrato/placebo).

CURVA DE KAPLAN-MEIER	AMOSTRA	HR (95% CI)
Efeito do tratamento (gêneros combinados)	Placebo (n=100) Nitrato (n=100)	1,06 (0,80-1,40)
Efeito do sexo (Intervenções combinadas)	Machos (n=100) Fêmeas (n=100)	1,76 (1,32-2,35)
Efeito do sexo e consumo de nitrato	Macho Nitrato (n=50) Fêmea Nitrato (n=50)	1,82 (1,23-2,80)
Efeito do sexo e consumo de placebo	Macho Placebo (n=50) Fêmea Placebo (n=50)	1,76 (1,17-2,65)

A interpretação do HR é baseada na relação entre o risco de morte, o sexo e a intervenção, de modo que os valores inferiores a um (<1) sinalizam resultados benéficos, onde houve redução do risco de morte; valores iguais a um ($=1$) demonstram que não há diferenças de risco entre os grupos; e valores maiores que um (>1), sinalizam resultados desfavoráveis, onde houve um maior risco de morte entre os grupos avaliados (Botelho et al., 2009).

Com isso, foi possível descrever as diferentes relações entre os grupos experimentais e o risco de morte. Quanto ao tratamento, o consumo de nitrato não demonstrou alterações sobre o risco de morte (HR=1,06), sugerindo se tratar de uma suplementação segura no que se refere à progressão da vida, resultados que independem do sexo e corroboram as análises de sobrevivência anteriores.

No entanto, ao isolar o efeito do sexo combinando os dados das intervenções (placebo - nitrato), foi possível identificar um risco 76% maior de morte para os animais do sexo masculino. Resultado que está em consonância com a redução do tempo de vida total dos machos em comparação com as fêmeas (Figura 7B). Ao dissociar as intervenções, o risco de morte se manteve maior nos machos: sendo 76% para o grupo placebo e 81% para os machos suplementados com nitrato inorgânico, ambos comparados às fêmeas com a mesma intervenção (Tabela 4).

Tais achados corroboram, em partes, com os resultados demonstrados por Moretti e colaboradores (2020), que avaliaram os efeitos da suplementação com nitrito sobre a longevidade em modelo experimental com invertebrados (moscas da fruta). Os autores verificaram que, para os machos, nenhuma concentração suplementar de nitrito foi responsável por alterações no tempo de vida total, ao passo que para as fêmeas houve um aumento da expectativa de vida em concentrações mais baixas (0,1 e 1 μM), sugerindo um efeito sexo-específico desse ânion sobre a longevidade. E, em ambos os sexos, não foram descritas alterações causadas pela suplementação de nitrito nas concentrações acima de 10 μM .

No tocante aos estudos sobre envelhecimento e longevidade, os avanços progressivos sobre as vias e biomarcadores deste processo promovem o desenvolvimento de diferentes intervenções (López-Otin et al. 2013). Estas, quando bem-sucedidas, podem aumentar a longevidade saudável dos indivíduos e, assim, desenvolver uma série de benefícios em cadeia, como o aumento na qualidade de vida, produtividade e até a redução dos custos de saúde (Bitto et al., 2016).

Do ponto de vista prático, a utilização de compostos e mecanismos que possam estender o tempo de vida útil ainda não é realidade. No entanto, nas últimas décadas diversas pesquisas relatam abordagens benéficas quanto ao tempo de vida e envelhecimento, seja sobre o apenas um órgão, como o

proposto por Chen e colaboradores (2019) no aumento da vida útil dos ovários a partir do xenotransplante de tecido adiposo marrom, ou sobre o organismo como um todo.

Mesmo com o objetivo comum de prolongar o tempo de vida, tais propostas de pesquisa utilizam vias completamente distintas, a exemplo das adaptações nos hábitos nutricionais, como a restrição calórica e jejum intermitente (Ekmekcioglu, 2019), as modulações no perfil metabólico (Wan et al., 2019), a regulação de mecanismos específicos como a autofagia (Aparicio et al., 2019) e na microbiota intestinal (Bárcena et al., 2019), e, por fim, a utilização de abordagens farmacológicas como a metformina (Piskovatska et al., 2019), rapamicina (Bitto et al., 2016) e o fulereno (C60). Este último promoveu o aumento de quase o dobro da expectativa de vida em ratos, no entanto, com ressalvas metodológicas, como o reduzido número amostral (Baati et al., 2012).

Se tratando especificamente do nitrato inorgânico, seu potencial benéfico frente a diversas condições patológicas é amplamente relatado, sobretudo nas últimas décadas, com a descrição da via nitrato-nitrito-óxido nítrico (Carlstrom et al., 2010; Khambata et al., 2017; Cordero-Herrera et al., 2018), o que por si só, pode refletir diretamente na longevidade e envelhecimento dos indivíduos.

Ainda nesse aspecto, as dietas ricas em nitrato inorgânico — aquelas com grandes quantidades de folhas verdes escuras — também são amplamente relacionadas com uma melhor qualidade de vida e conseqüentemente, com o envelhecimento saudável (Brkic et al., 2017; Vidaček et al., 2017).

No entanto, a maioria dos estudos sobre a via nitrato-nitrito-óxido nítrico, seja a partir da suplementação com nitratos inorgânicos (NaNO_3) ou pelo consumo de vegetais ricos em nitratos, sinalizam a necessidade de avaliação dos efeitos do consumo a longo prazo. Mesmo com resultados benéficos a curto prazo, seu consumo crônico pode desencadear efeitos adversos ainda não conhecidos.

Assim, os dados apresentados neste trabalho são inéditos e apresentam indícios sobre a segurança do consumo crônico de nitrato inorgânico e a ausência de influência sobre a expectativa de vida e longevidade de ratos Wistar, principalmente nos indivíduos do sexo feminino. Tais resultados validam os efeitos benéficos apresentados a partir do consumo a curto prazo e sinalizam para a seu potencial benéfico também a longo prazo. Todavia, mais

investigações sobre as formas de suplementação e sua relação dose-dependente são indicadas.

4.3 Avaliações bioquímicas

4.3.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de radicais livres ou pela diminuição nos processos de eliminação e metabolismo dos mesmos (Carlstrom; Montenegro, 2019). Aqui, cabe descrever que os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas, pois tem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada externa, e são formados por todas as células com metabolismo aeróbio do organismo a partir da perda ou aceitação de um único elétron (Liguori et al., 2018).

Tais moléculas são subdivididas em dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS), que se referem a radicais reativos e derivados não radicais do oxigênio e nitrogênio, respectivamente (Carlstrom; Montenegro, 2019).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) apresentam duas fontes de produção com base na sua origem: endógenas e exógenas. As fontes endógenas, como o nome sugere, são ROS oriundas do processo metabólico celular, como a respiração mitocondrial. Já as fontes exógenas, a poluição do ar e da água, álcool, metais pesados, radiação, drogas entre outros (Liguori et al., 2018).

Com base na descrição das fontes de ROS, é possível visualizar que o aumento de sua produção ou diminuição da eliminação dos radicais livres, ou seja, o estresse oxidativo, é uma condição multifatorial e diretamente relacionada à capacidade funcional do tecido. Nesse sentido, o estresse oxidativo foi relacionado com a fisiopatogenia de diferentes condições patológicas, onde existem alterações na função tecidual, como o câncer (Wiseman; Halliwell, 1996), morte neuronal (Ramdial et al., 2017), obesidade (Ashor et al., 2016) e doenças cardiovasculares (Pignatelli et al., 2018).

Dessa forma, sabendo que o envelhecimento é caracterizado pela perda progressiva da função dos órgãos e tecidos dependente do tempo, é possível

correlacionar o aumento do estresse oxidativo com o tempo de vida dos indivíduos. Assim, quanto maior a idade, maiores serão os efeitos causados pelos radicais livres nos tecidos (Wadhwa et al., 2018; Liguori et al., 2018).

Essa relação foi primeiramente proposta por Harman (1992), que a chamou de teoria dos radicais livres do envelhecimento, e mais tarde denominada como teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, que é baseada na hipótese de que as perdas funcionais associadas à idade são devido ao acúmulo de dano oxidativo às macromoléculas (lipídios, DNA e proteínas) por RONS. Isso ocorre de modo a compor um ciclo de retroalimentação onde mais danos funcionais são gerados, o que reflete em mais RONS e assim sucessivamente (Koltover, 2017).

Os resíduos dos danos oxidativos às macromoléculas, juntamente como os sistemas de defesa antioxidante que protegem os sistemas biológicos da toxicidade dos radicais livres, podem ser usados como marcadores de estresse oxidativo. Dentre estes, destacam-se a avaliação das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH), a avaliação da capacidade antioxidante total e a quantificação dos resíduos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA)(Frijhoff, et al., 2015).

Neste trabalho, diante das possibilidades investigativas supracitadas e da limitação na quantidade de soro plausível de coleta a cada três meses, o indicador do estresse oxidativo avaliado foi a concentração sérica de MDA, realizada periodicamente em animais idosos tratados ou não com nitrato inorgânico, de ambos os sexos (Figura 11A)(Tabela 5).

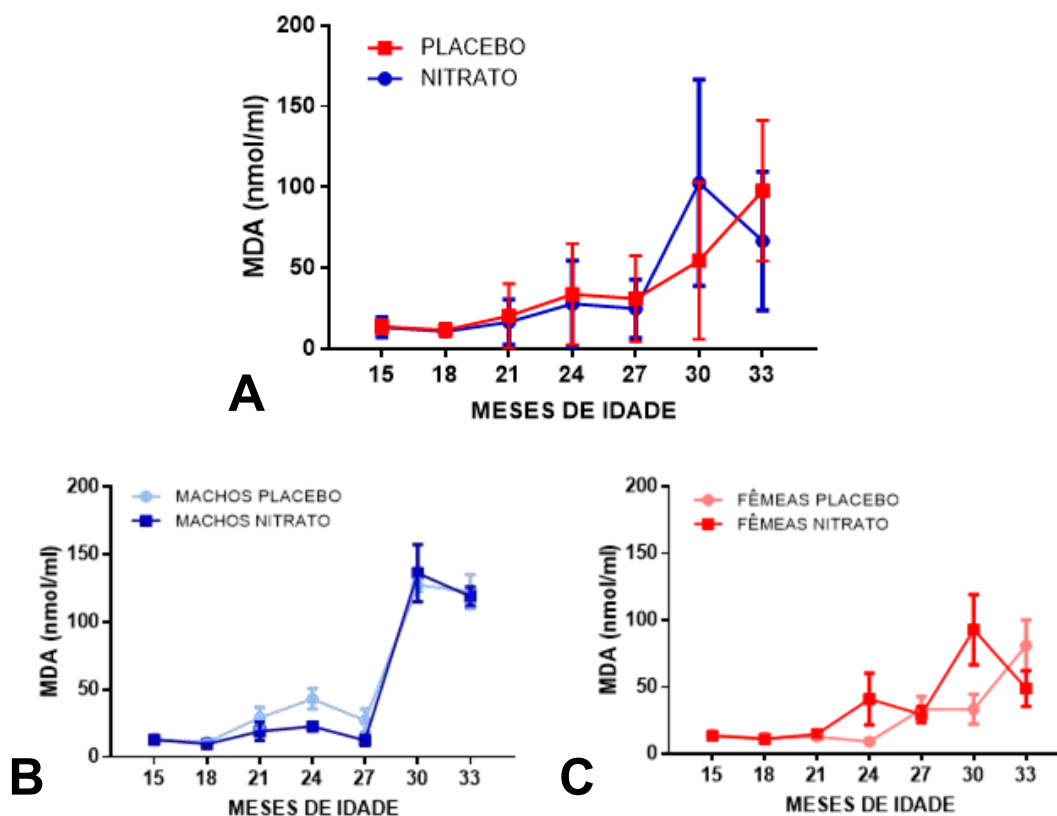


Figura 11. Concentrações séricas de Malondialdeído (MDA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

Tabela 5: Concentrações séricas de Malondialdeído (MDA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2). Valores expressos em média \pm SEM.

	GRUPOS	IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
MDA (nmol/ml)	Fêmea Placebo	14,02 \pm 0,9	11,78 \pm 1,2	12,99 \pm 1,3	9,22 \pm 1,4	33,4 \pm 9,4	33,6 \pm 11,1	81,1 \pm 19,1
	Fêmea Nitrato	14,63 \pm 1,7	11,21 \pm 1,3	14,83 \pm 1,9	75,2 \pm 22,1*	29,5 \pm 6,0	93,0 \pm 26,2	49,0 \pm 13,4
	Macho Placebo	13,15 \pm 1,4	11,11 \pm 1,1	35,19 \pm 9,3	38,7 \pm 6,5	27,1 \pm 8,4	131,7 \pm 15,4	122,7 \pm 12,5
	Macho Nitrato	11,61 \pm 0,6	9,74 \pm 0,3	18,66 \pm 6,0	22,7 \pm 2,9	12,3 \pm 3,6	98,5 \pm 41,4	119,2 \pm 6,8

Valores expressos em média \pm SEM. * $p < 0,05$ NITRATO vs PLACEBO.

Como descrito anteriormente, o declínio funcional dependente do tempo causado pelo processo de envelhecimento é responsável pelo aumento do estresse oxidativo, descrições que corroboram os achados neste trabalho. Onde foi possível visualizar um aumento progressivo das concentrações séricas de MDA proporcional ao tempo de vida, tanto em machos (Figura 11B) quanto em fêmeas (Figura 11C), sobretudo a partir dos 27 meses de idade.

No que se refere ao tratamento, os dados sugerem que o consumo crônico de nitrato inorgânico não exerceu funções sobre o estresse oxidativo de animais idosos (Figura 11A – Tabela 5). No entanto, a suplementação com nitrato inorgânico é amplamente relacionada com a melhora no perfil oxidativo dos indivíduos em diferentes modelos experimentais (Carlstrom; Montenegro, 2019; Tian et al., 2020).

Gao e colaboradores (2015) demonstram que o tratamento crônico com nitrato ou tratamento agudo com nitrito reduziu efetivamente o estresse oxidativo induzido por NADPH oxidase e aumentou a formação de NO na microvasculatura renal. Tais dados são similares aos achados benéficos do consumo de nitrato inorgânico sobre a obesidade e diabetes tipo 2 descritos por Gheibi e colaboradores (2018).

Os efeitos positivos do consumo de nitratos inorgânico sobre o estresse oxidativo também foram demonstrados em outras condições de interesse, como sobre a doença cardiorenal (Carlstrom; Montenegro, 2019), diabetes (Tian et al., 2020), injúria por isquemia e reperfusão (Yang et al., 2017), hipertensão (Carlstrom et al., 2011) e sobre as alterações oxidativas causadas pelo exercício (Menezes et al., 2019).

Contudo, por se tratar de uma molécula conhecida tóxica, o nitrato inorgânico em grandes quantidades também pode provocar quadros de intoxicação aguda por alterações no estresse oxidativo, como descrito por Baek e colaboradores (2015), onde demonstram que a infusão de 12,5mg de NaNO_3 diretamente no sistema vascular pelo acesso da veia jugular foi responsável por aumentar significativamente o estresse oxidativo (MDA e HAE) e injúria direta ao parênquima renal em porquinhos-da-índia. Do mesmo modo, como o apontado por Delgado e colaboradores (2008), onde o consumo de nitrato por via oral por 10 dias foi responsável pelo aumento de diversos marcadores do estresse oxidativo (MDA, SOD, GSH) de forma dose-dependente.

Sendo assim, os efeitos do consumo de nitrato inorgânico sobre o estresse oxidativo são controversos e apresentam-se proporcionais a dose e ao tempo de exposição. Os estudos que descrevem os efeitos da ingestão de nitratos utilizam tempos de tratamento relativamente curtos, em média, variando de duas semanas a dois meses (Carlstrom et al.; 2011; Yang et al., 2017; Tian et al., 2020).

Neste trabalho, os resultados demonstram que após a suplementação com nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) de forma ininterrupta e por um longo período (mais de 15 meses), não foi possível identificar quadros de intoxicação ou aumento do estresse oxidativo em animais idosos tratados com nitrato quando comparados ao grupo placebo. No entanto, efeitos benéficos também não foram descritos e as alterações evidentes parecem ser desencadeadas pelo processo natural de envelhecimento.

4.3.2 Atividade hepática

O fígado, uma glândula anexa ao trato gastrointestinal, desempenha um papel crucial na fisiologia desse sistema, tanto pela produção de sais biliares emulsificantes, que facilitam a absorção das gorduras, quanto pela filtração de tóxicos e processamento dos nutrientes recém absorvidos, sendo conhecido inclusive como o “filtro biológico” do organismo. Todavia, as funções do fígado não se limitam apenas ao sistema digestivo, pois este órgão também está envolvido na regulação do metabolismo energético, biossíntese de moléculas, na resposta imune, entre outras (Maeso-Díaz et al., 2018).

Com base na importância fisiológica de suas funções e dos efeitos no metabolismo de fármacos e no sistema imune, atualmente o fígado é um dos principais órgãos-alvo das pesquisas que envolvem o processo de envelhecimento. Pois, assim como em outros tecidos, a passagem do tempo acarreta mudanças morfológicas e funcionais, de modo que a melhor compreensão dessas alterações seja imprescindível para prevenção e gestão das condições patológicas em idosos (Pibiri et al., 2018).

No que se refere ao efeito do tempo sobre o parênquima hepático, do ponto de vista macroscópico, é possível identificar uma redução da massa total do órgão (entre 20-40%) em pacientes idosos. Além disso, há uma marcada

redução de sua capacidade generativa, uma das principais características do fígado (Ono et al., 2011). Em roedores jovens, por exemplo, a remoção de 2/3 do tecido hepático pode ser regenerada em apenas 7 a 10 dias, o que não acontece em animais idosos (Pibiri et al., 2018).

Estima-se que com a idade haja uma redução no fluxo sanguíneo hepático (entre 35-50%) e no metabolismo de drogas (mais de 30%), além de alterações na imunidade inata e adaptativa. Por outro lado, quanto a função, embora tenha uma grande influência individual e dos hábitos durante a vida, as funções hepáticas são relativamente preservadas em idosos, havendo descrição de poucas alterações bioquímicas com o passar do tempo, como a redução da bilirrubina e da enzima alanina aminotransferase (ALT). O que sinaliza para a necessidade de utilizar valores de referência ajustáveis na interpretação de exames de para pacientes idosos (Tajiri; Shimizu, 2011).

Nesse âmbito, a avaliação laboratorial das lesões e da função hepática é uma importante ferramenta de diagnóstico e acompanhamento clínico/experimental, além de oferecer informações valiosas para a compressão das alterações nesse tecido. As técnicas para avaliação da lesão hepática envolvem a dosagem da atividade de enzimas que podem ser decorrentes do extravasamento (após lesão celular) ou da indução de aumento na produção da enzima. Diferentemente das técnicas que avaliam a função, pois envolvem a dosagem de substâncias que normalmente são removidas do sangue pelo fígado (Allison, 2017).

O presente trabalho avalia os efeitos do consumo de nitrato inorgânico sobre o tecido hepático em animais idosos pela avaliação bioquímica das: (1) enzimas de extravasamento: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), antes conhecidas como transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico-oxalacética (TGO); (2) enzimas de indução: fosfatase alcalina (FA) e γ -glutamilttransferase (GGT); e (3) dosagem das concentrações séricas de colesterol (CT) e lipoproteínas de alta densidade (HDL), para avaliação da função hepática e perfil lipídico. Todos os testes foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante Bioclin® (Minas Gerais, Brasil).

Quanto às enzimas de extravasamento, que indicam a presença de lesões ou danos diretos aos hepatócitos (letal ou subletal), não houve diferenças entre

os grupos que consumiram nitrato e placebo (Figura 12-13A), e os valores se encontram dentro dos limites para espécie (Tabela 6) (Campbell, 2017).

Tabela 6: Concentrações séricas de ALT e AST em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2). Valores expressos em média \pm SEM.

GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
ALT (U/L)	Fêmea Placebo	71,1 \pm 7,3	94,6 \pm 5,6	87,6 \pm 3,7	80,8 \pm 3,8	66,7 \pm 6,6	72,3 \pm 10,4	131,9 \pm 10,1
	Fêmea Nitrato	80,3 \pm 6,2	95,8 \pm 4,7	90,6 \pm 2,9	97,5 \pm 7,8	75,5 \pm 5,9	112,1 \pm 22,0	164,2 \pm 40,7
	Macho Placebo	72,6 \pm 4,3	92,1 \pm 7,1	126,3 \pm 9,5	123,8 \pm 22,9	68,6 \pm 8,6	89,9 \pm 10,1	68,0 \pm 5,8
	Macho Nitrato	76,0 \pm 6,9	90,5 \pm 10,4	113,8 \pm 9,0	115,9 \pm 20,3	77,3 \pm 5,0	91,8 \pm 13,2	108,2 \pm 35,0
GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
AST (U/L)	Fêmea Placebo	104,5 \pm 6,1	125,0 \pm 6,2	123,3 \pm 6,5	131,2 \pm 8,3	133,4 \pm 20,9	160,4 \pm 27,7	78,5 \pm 8,3
	Fêmea Nitrato	116,8 \pm 7,8	130,9 \pm 6,9	126,6 \pm 5,6	145,4 \pm 22,6	117,7 \pm 12,6	161,5 \pm 56,5	67,1 \pm 6,6
	Macho Placebo	77,3 \pm 3,3	92,7 \pm 3,9	133,7 \pm 10,7	161,8 \pm 21,9	98,0 \pm 18,0	131,6 \pm 15,8	105,5 \pm 1,0
	Macho Nitrato	89,6 \pm 7,4	98,4 \pm 4,8	137,9 \pm 13,8	149,9 \pm 18,5	98,7 \pm 16,1	120,2 \pm 4,5	207,6 \pm 77,1

Valores expressos em média \pm SEM. * $p < 0,05$ NITRATO vs PLACEBO.

Ao dissociar o fator sexo, foi possível identificar uma marcada sobreposição dos grupos tratados e não tratados com nitrato desde o início do tratamento, tanto em machos (Figura 12-13B) quanto em fêmeas (Figura 12-13C). No que se refere à passagem do tempo, houve um aumento progressivo da concentração enzimática de ALT, sobretudo a partir dos 27 meses de idade, e o inverso quanto a AST, onde houve uma redução de suas concentrações a partir do mesmo período.

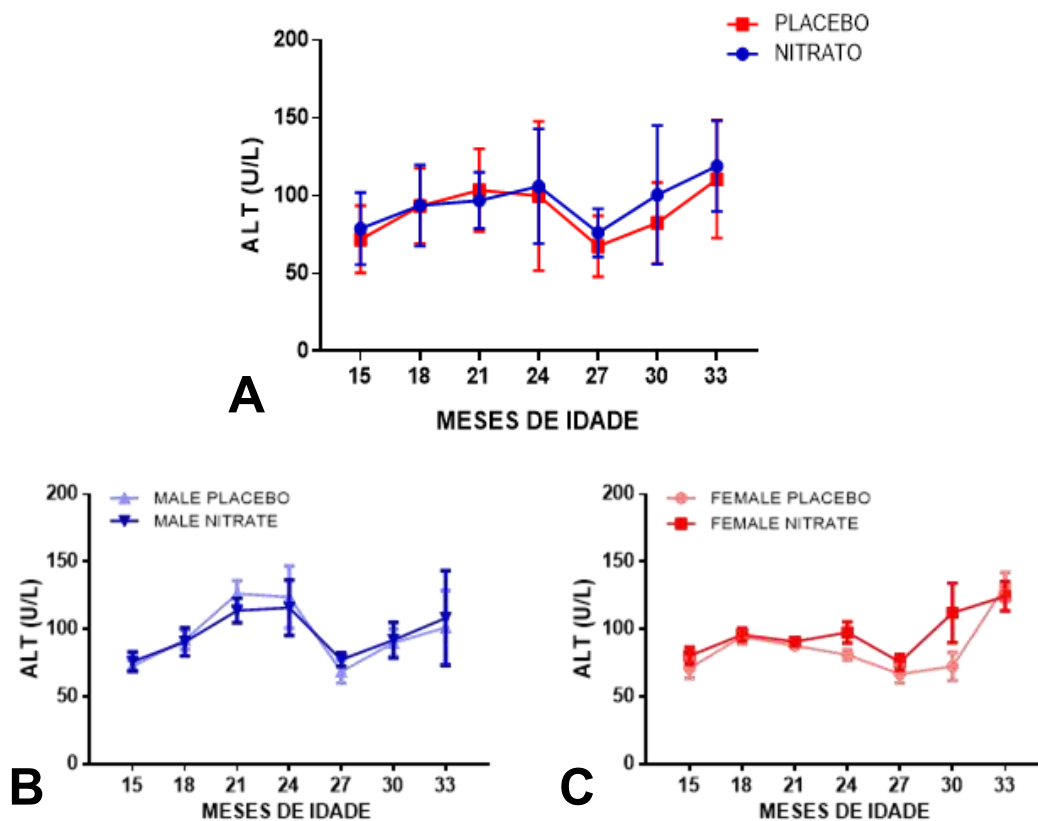


Figura 12. Concentrações séricas de alanina aminotransferase (ALT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

Maeso-Díaz e colaboradores (2018) relatam a ausência de alterações significativas das concentrações de ALT e AST em ratos Wistar de 3 e 20 meses de idade. Tal apontamento difere dos achados de Wang e colaboradores (2018) em camundongos, que demonstram o aumento substancial dos mesmos marcadores em animais com 18 meses de idade, havendo o aumento de quase o dobro em comparação com animais de 6 e 2 meses de idade.

Em ratos e camundongos, assim como em outros mamíferos, a ALT é uma enzima basicamente hepatoespecífica e o aumento da sua atividade sérica está relacionado proporcionalmente a quantidade de células lesionadas por doenças hepáticas agudas, como alterações metabólicas, infecções, neoplasias, quadros inflamatórios e tóxicos, entre outras (Allison, 2017).

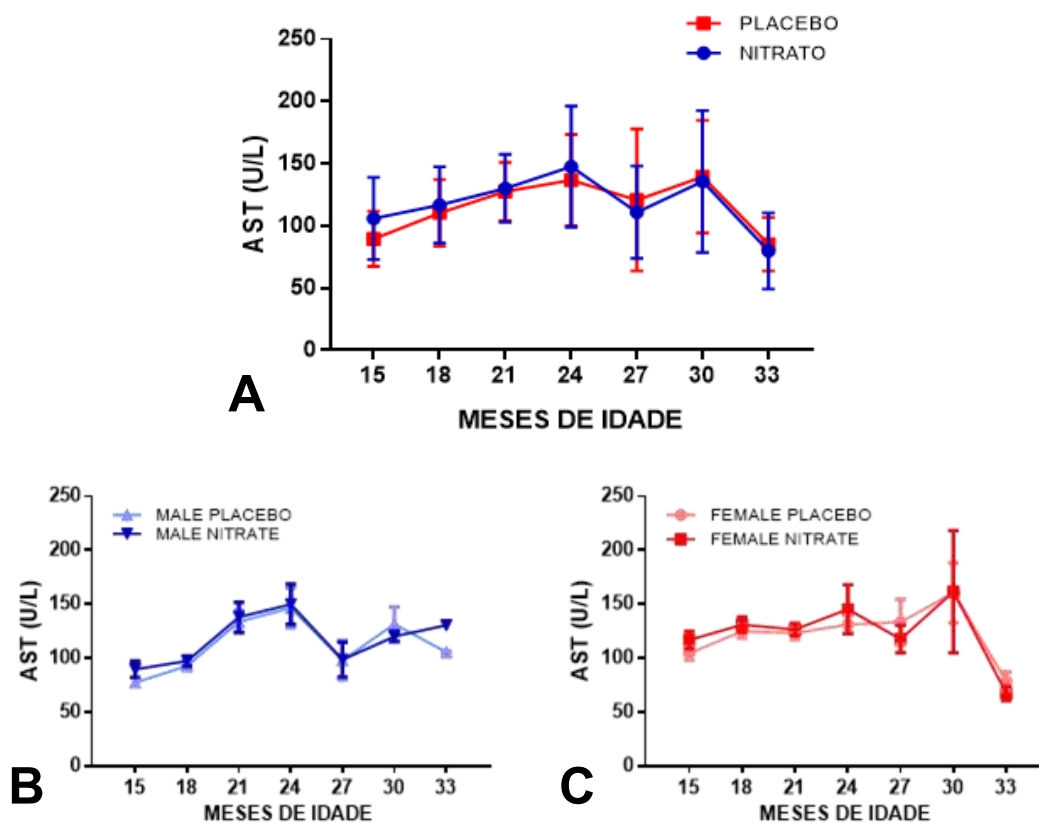


Figura 13. Concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

No entanto, a AST não pode ser considerada hepatoespecífica e pode estar presente tanto nos hepatócitos quanto em células musculares estriadas (cardíacas e esqueléticas), de modo que o aumento na atividade sérica da AST pode ser relacionado com os quadros de lesões nos hepatócitos e nas células musculares. Cabe ressaltar também que a diminuição da AST (Figura 13) com o aumento da idade pode ser justificado pela redução do parênquima hepático e da massa muscular, alterações características do envelhecimento (Ono et al., 2011; Allison, 2017; Pibiri et al., 2018).

Quanto às enzimas de indução, mesmo com uma maior variação entre os grupos, também não foi possível identificar diferenças causadas pelo consumo de nitrato (Tabela 7). No entanto, no que se refere ao tempo de tratamento, houve um aumento progressivo a partir dos 24 meses de idade (ou 9 meses de

tratamento), principalmente na atividade sérica da fosfatase alcalina (Figuras 14 e 15).

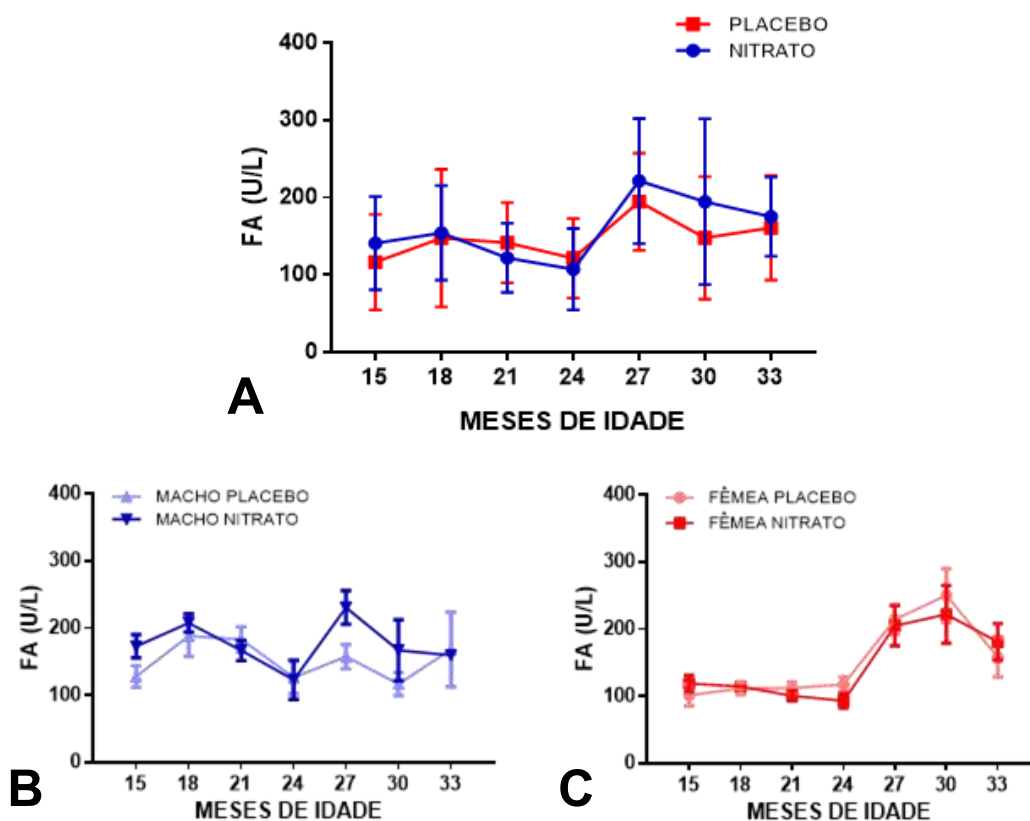


Figura 14. Concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

As enzimas de indução supracitadas são avaliadas no soro sanguíneo e podem indicar a presença de colestase (comprometimento do fluxo biliar), todavia, ambas estão envolvidas em outros processos fisiológicos, inclusive para além do fígado. A fosfatase alcalina é uma enzima de indução presente nas membranas celulares e é sintetizada por vários tecidos ou órgãos, como fígado, ossos, rins, intestinos, pâncreas e placenta. De modo que, por não ser hepatoespecífica, seu aumento pode estar relacionado com outros fatores não-hepáticos, como crescimento ósseo (atividade osteoblástica), terapia medicamentosa, doenças endócrinas, estágio gestacional e neoplasias (Fernandez; Kidney, 2007).

Tabela 7: Concentrações séricas de FA e GGT em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2). Valores expressos em média \pm SEM.

GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
FA (U/L)	Fêmea Placebo	101,9 \pm 16,0	111,7 \pm 9,0	112,4 \pm 9,2	117,9 \pm 10,8	214,8 \pm 21,7	244,8 \pm 64,6	158,3 \pm 29,3
	Fêmea Nitrato	119,2 \pm 12,1	114,7 \pm 6,7	100,9 \pm 7,3	93,55 \pm 10,7	205,2 \pm 29,6	222,1 \pm 43,0	181,3 \pm 27,3
	Macho Placebo	128,1 \pm 16,1	169,9 \pm 25,8	183,5 \pm 18,7	126,8 \pm 24,8	157,9 \pm 18,0	117,0 \pm 17,1	168,6 \pm 55,3
	Macho Nitrato	173,1 \pm 17,2	208,0 \pm 13,6	167,1 \pm 15,2	123,2 \pm 29,2	210,6 \pm 20,9	167,1 \pm 45,2	159,8 \pm 4,4
GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
GGT (U/L)	Fêmea Placebo	2,69 \pm 0,2	4,17 \pm 0,3	2,18 \pm 0,3	2,21 \pm 0,5	2,35 \pm 0,64	3,45 \pm 1,2	3,83 \pm 1,1
	Fêmea Nitrato	4,01 \pm 0,4	4,10 \pm 0,3	2,82 \pm 0,2	1,94 \pm 0,9	2,89 \pm 0,5	3,69 \pm 1,4	5,45 \pm 0,5
	Macho Placebo	2,78 \pm 0,5	2,81 \pm 0,5	2,10 \pm 0,9	2,18 \pm 0,8	3,72 \pm 0,7	2,48 \pm 0,6	4,13 \pm 1,0
	Macho Nitrato	1,76 \pm 0,4	3,16 \pm 0,8	2,75 \pm 0,1	3,70 \pm 1,3	4,15 \pm 0,6	2,45 \pm 1,0	4,03 \pm 0,7

Valores expressos em média \pm SEM. * $p < 0,05$ NITRATO vs PLACEBO.

De forma similar, outra enzima de indução, a γ -glutamilttransferase (GGT), é sintetizada na maioria dos tecidos corporais, com maior concentração no pâncreas e nos rins. Porém, também está presente em baixa concentração nos hepatócitos, no epitélio de ductos biliares e na mucosa intestinal, e em alta concentração nas glândulas mamárias. Quanto às variações séricas dessa enzima, temos que as lesões hepáticas causam aumento da GGT por liberação de fragmentos presentes na membrana, diferente da colestase que aumenta a produção e solubilização da enzima aderida à membrana celular (Kobayashi et al., 2020).

Cabe ressaltar ainda que, em roedores, tanto a FA quanto a GGT apresentam alta atividade no tecido renal, e a mensuração dessas enzimas em amostras de urina é de grande utilidade. Entretanto, as lesões renais causam extravasamento das enzimas dos túbulos renais para o lúmen e, em menor quantidade, para o espaço extracelular. Com isso, o aumento da atividade

enzimática é perceptível ao analisar a urina, porém não é possível detectar tais alterações no sangue (Campbell, 2017).

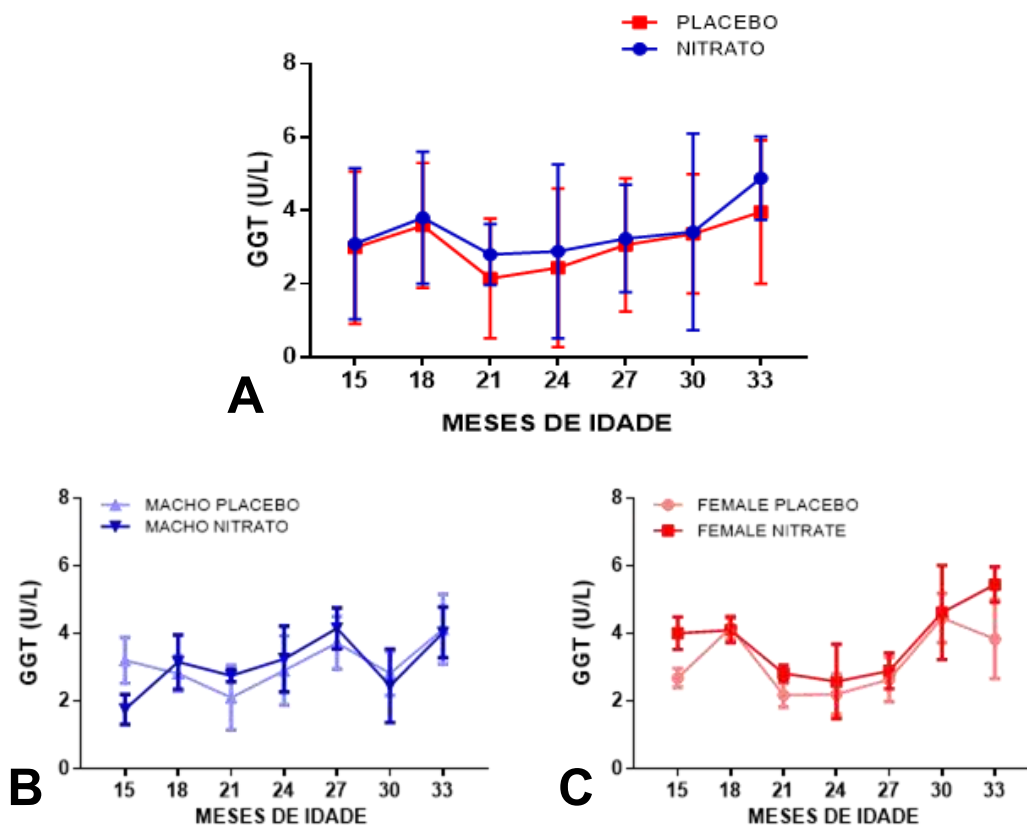


Figura 15. Concentrações séricas de γ -glutamyltransferase (GGT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

Por fim, o último subgrupo para análise do fígado são as avaliações de sua função, que objetiva a dosagem de substâncias que normalmente são removidas do sangue pelo fígado e, em seguida, metabolizadas ou excretadas pelo sistema biliar (bilirrubina, ácidos biliares, amônia, colesterol) e de substâncias normalmente sintetizadas pelo fígado (albumina, globulinas, ureia, colesterol e fatores de coagulação). Vale destacar que por mais que alterações nestes marcadores também possam ser causadas por fatores extra-hepáticos, a detecção de valores bioquímicos anormais juntamente às evidências de lesão

hepática fornecem informações adicionais valiosas para o diagnóstico das doenças hepáticas e quadros de insuficiência hepática (Allison, 2017).

A cada três meses, o sangue dos animais foi coletado pela punção da veia da cauda para as análises bioquímicas. Devido a quantidade de testes realizados em cada amostra e a limitação na quantidade de sangue que pudesse ser coletada sem interferência no delineamento experimental e/ou a morte dos animais, para a avaliação da função hepática e do perfil lipídico foi necessária a priorização da dosagem das concentrações séricas de colesterol total e lipoproteínas de alta densidade (Tabela 8).

Tabela 8: Concentrações séricas de colesterol total e HDL em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2). Valores expressos em média \pm SEM.

GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	Fêmea Placebo	81,0 \pm 19,2	78,3 \pm 13,7	77,6 \pm 20,9	97,9 \pm 25,2	196,5 \pm 47,6	139,2 \pm 64,1	389,1 \pm 68,6
	Fêmea Nitrato	72,4 \pm 11,7	72,2 \pm 10,2	114,1 \pm 21,8	55,9 \pm 7,0	177,4 \pm 35,1	160,5 \pm 50,9	333,5 \pm 29,9
	Macho Placebo	116,1 \pm 20,0	109,9 \pm 22,4	137,7 \pm 47,3	196,8 \pm 31,4	171,9 \pm 27,2	212,3 \pm 22,9	309,7 \pm 73,3
	Macho Nitrato	104,0 \pm 19,2	100,6 \pm 17,9	104,6 \pm 40,5	185,6 \pm 55,1	212,5 \pm 66,4	154,6 \pm 25,2	237,2 \pm 1,5
GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
HDL (mg/dL)	Fêmea Placebo	36,6 \pm 2,6	34,4 \pm 2,9	34,5 \pm 3,7	39,7 \pm 5,9	17,2 \pm 2,9	32,1 \pm 11,8	39,9 \pm 2,2
	Fêmea Nitrato	29,5 \pm 3,4	29,7 \pm 2,4	33,1 \pm 1,5	18,0 \pm 5,1	20,8 \pm 3,9	42,1 \pm 0,5	39,4 \pm 1,8
	Macho Placebo	24,0 \pm 1,5	29,6 \pm 1,2	34,4 \pm 1,9	52,9 \pm 6,3	28,4 \pm 6,7	35,4 \pm 2,9	42,1 \pm 4,5
	Macho Nitrato	31,8 \pm 2,6	30,5 \pm 3,7	31,9 \pm 3,2	34,9 \pm 7,4	46,5 \pm 9,9	28,5 \pm 4,2	37,7 \pm 5,7

Valores expressos em média \pm SEM. * $p < 0,05$ NITRATO vs PLACEBO.

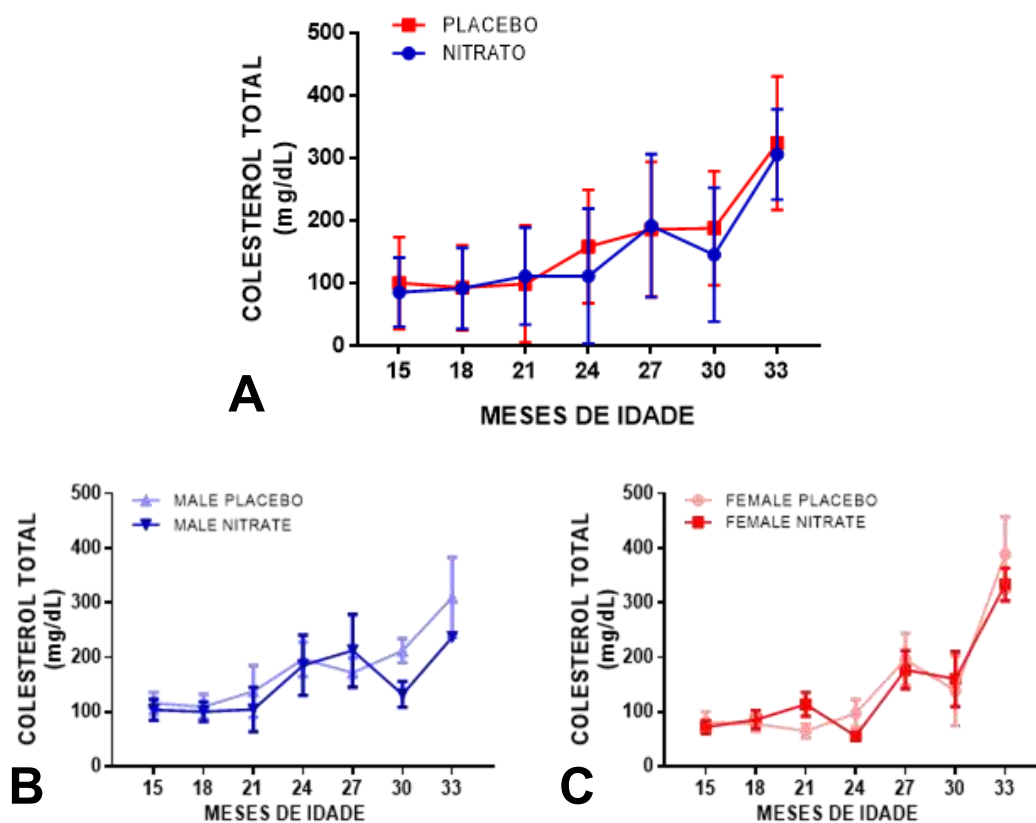


Figura 16. Concentrações séricas de colesterol (CT) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

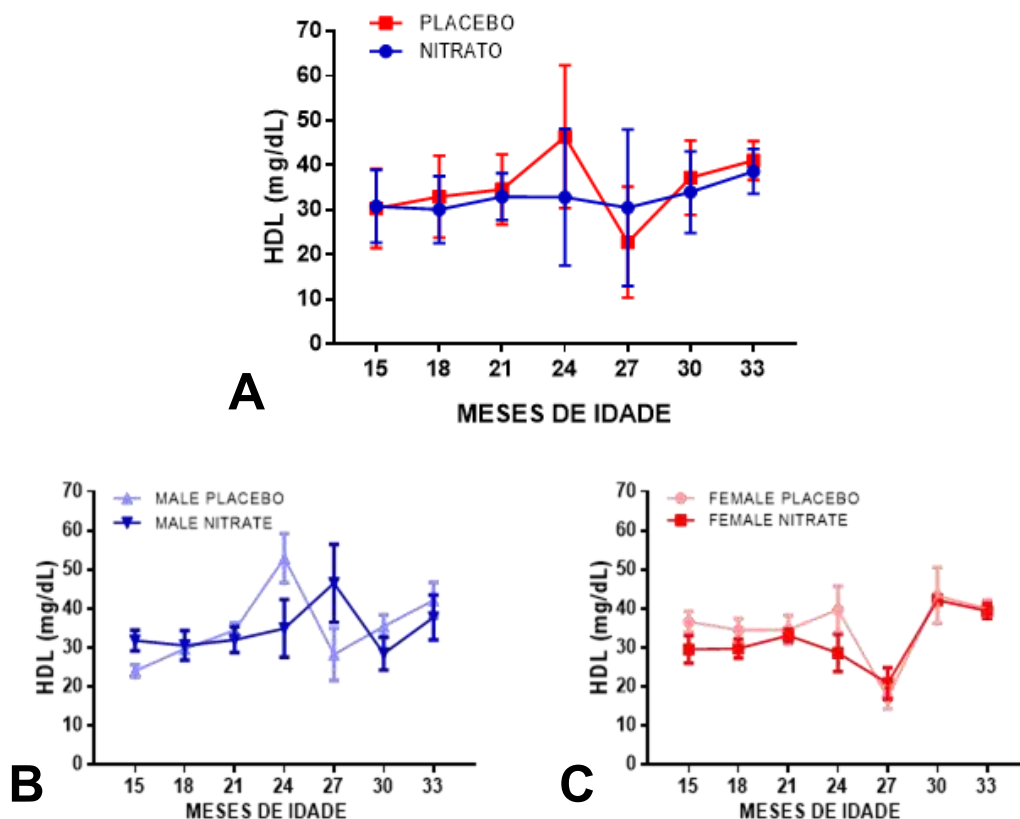


Figura 17. Concentrações séricas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

Quanto à intervenção experimental, o consumo de nitrato inorgânico não foi responsável por nenhuma alteração nos marcadores do perfil lipídico ao longo do tempo (Tabela 8). No entanto, no que se refere ao processo de envelhecimento, foi possível identificar um aumento progressivo nas concentrações plasmáticas de colesterol total, principalmente a partir dos 24 meses de idade (Figura 16). Já a respeito das concentrações séricas de HDL, houve também um aumento progressivo dependente do tempo, porém consideravelmente menor quando comparado ao colesterol total (Figura 17).

Ambos os resultados corroboram o descrito por Maeso-Díaz e colaboradores (2018), onde, ao comparar os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar com 3 e 20 meses de idade, descrevem o aumento do colesterol total (aproximadamente 69%) e de outros parâmetros bioquímicos do perfil lipídico

(aumento de até 140% no LDL plasmático), além de variações mais discretas no HDL, com o aumento de 19% nas concentrações plasmáticas de animais idosos em relação aos animais jovens.

Sabendo que o aumento progressivo dependente do tempo nas concentrações séricas dos marcadores do perfil lipídico é uma característica marcante do processo de envelhecimento, Wang e colaboradores (2018) avaliaram o efeito do consumo de nitrato inorgânico em doses baixas sobre o perfil lipídico, relatando a redução significativa do colesterol e triglicerídeos plasmáticos. O achado é similar ao descrito por Li e colaboradores (2016), porém usando uma fonte natural de nitrato, o espinafre, responsável também por uma redução dos biomarcadores e melhora do perfil lipídico.

No mesmo âmbito, as concentrações do colesterol no sangue e demais alterações no perfil lipídico são amplamente relacionadas como fatores de risco para desenvolvimento de doenças, sobretudo quando envolvem o sistema cardiovascular (Soliman, 2018). Por outro lado, estudos demonstram que níveis mais elevados de colesterol total estão associados ao menor risco de mortalidade “all-cause”, em tradução livre “por todas as causas”, especialmente no que se refere à mortalidade não cardiovascular entre os idosos. Isto sugere um efeito protetor da hipercolesterolemia nos estágios finais de vida e sinaliza a necessidade de cautela na prescrição de medicamentos que objetivam a redução do colesterol plasmático, especialmente em idosos (Liang et al., 2017; Yi et al., 2019).

Quanto ao paralelo entre o consumo de nitratos inorgânicos e a atividade hepática como um todo, os resultados são conflitantes. Inicialmente, cabe ressaltar que nos idosos há uma notável redução das concentrações plasmáticas e teciduais de nitrato. No entanto, esse efeito do tempo pode ser revertido, como demonstrado por Wang e colaboradores (2018), segundo os quais a redução drástica (aproximadamente 50%) da concentração plasmática e hepática de nitrato causada pelo tempo foi revertida pela suplementação com nitrato inorgânico por via oral.

Do ponto de vista funcional do fígado, o consumo de nitrato inorgânico por 7 meses (em doses similares ao consumo de vegetais ricos em nitrato) foi responsável por desencadear um efeito protetor sobre o declínio funcional relacionado ao envelhecimento neste órgão, provocando uma notável redução

da lesão hepática e diminuição das alterações morfológicas e biomarcadores do envelhecimento, tanto em modelo de envelhecimento induzido (D-gal), quanto em animais naturalmente idosos (Wang et al., 2018).

Por outro lado, Delgado e colaboradores (2008) descrevem que a administração de nitrato de sódio (NaNO_3), nas doses de 19, 66 e 150mg/kg, por via oral durante 10 dias foi responsável por um quadro de intoxicação subaguda e induziu alterações hematológicas e bioquímicas, além de injúria ao tecido hepático. As lesões foram proporcionais à dose, de maneira que os quadros graves de lesão hepática e alterações nos biomarcadores foram mais expressivos nos animais que consumiram as maiores doses. De forma similar, Bouaziz-Ketata e colaboradores (2014) utilizaram a dose de 400mg/kg de nitrato para desenvolvimento do modelo experimental de lesão hepática, sendo responsável por alterações bioquímicas e histopatológicas graves e características em apenas 50 dias.

Dessa forma, é possível observar que o consumo de pequenas quantidades de nitrato inorgânico apresenta resultados benéficos sobre a função e morfologia hepática, inclusive no que concerne às alterações causadas pelo envelhecimento (Wang et al., 2018). Em contrapartida, o consumo de grandes quantidades de nitrato, mesmo que por um curto período, pode ser responsável por lesões hepáticas significativas e quadros de intoxicação (Delgado et al., 2008; Bouaziz-Ketata et al., 2014).

Diante disso, os dados inéditos deste trabalho sugerem que, a priori, a suplementação com nitrato inorgânico, por um longo período de tempo (consumo por mais de 21 meses), não foi responsável por induzir lesão hepática e alterações funcionais. Ademais, o tratamento crônico não apresentou riscos ao tecido hepático, sobretudo em animais idosos.

4.3.3 Atividade renal

O sistema urinário desempenha um importante papel na homeostase do organismo e não somente no que se refere ao equilíbrio hidroeletrólítico. Pois, os rins além de controlarem o volume dos líquidos extracelulares, ainda apresentam funções como a regulação da pressão arterial e da osmolaridade,

manutenção do equilíbrio iônico, excreção de resíduos, produção de hormônios e regulação homeostática do pH (Silverthorn, 2017).

Tais funções são inerentes à vida e sobrevivência das espécies, e fazem do sistema urinário um dos principais alvos do processo natural de envelhecimento e regulação do tempo de vida dos indivíduos. No entanto, inicialmente as alterações estruturais e funcionais no rim causadas pela idade devem ser classificadas em: aquelas observadas com envelhecimento saudável, aquelas onde o envelhecimento avança com uma comorbidade esperada (hipertensão, diabetes, obesidade) e aquelas onde o envelhecimento avança juntamente a uma doença renal específica (Denic et al., 2016).

No que diz respeito às alterações durante o processo de envelhecimento saudável, ou seja, sem contribuição de comorbidades ou doenças específicas, Hommos e colaboradores (2017) classificam as principais alterações renais causadas pelo envelhecimento em três grandes grupos:

- (1) Alterações macroscópicas: Aterosclerose da artéria renal, diminuição do volume cortical e aumento do volume medular, aumento da irregularidade na superfície renal e do número e tamanho dos cistos renais.
- (2) Alterações microscópicas: Fibrose intersticial, esclerose glomerular, redução do número de néfrons viáveis, atrofia tubular com hipertrofia dos túbulos remanescentes, espessamento da membrana basal, entre outras.
- (3) Alterações funcionais: Diminuição da taxa total de filtração glomerular, redução da produção de hormônios, redução da capacidade de filtração individual dos néfrons, entre outras.

Todavia, mesmo com as alterações supracitadas causadas pelo intenso efeito do tempo, para o desenvolvimento de distúrbios funcionais graves que caracterizem os quadros de insuficiência renal é necessária a perda de 75% (3/4) dos néfrons viáveis. Tal fato corrobora os achados em indivíduos que doaram um rim e sobrevivem devido a capacidade de reserva do tecido renal (Meuten, 2017).

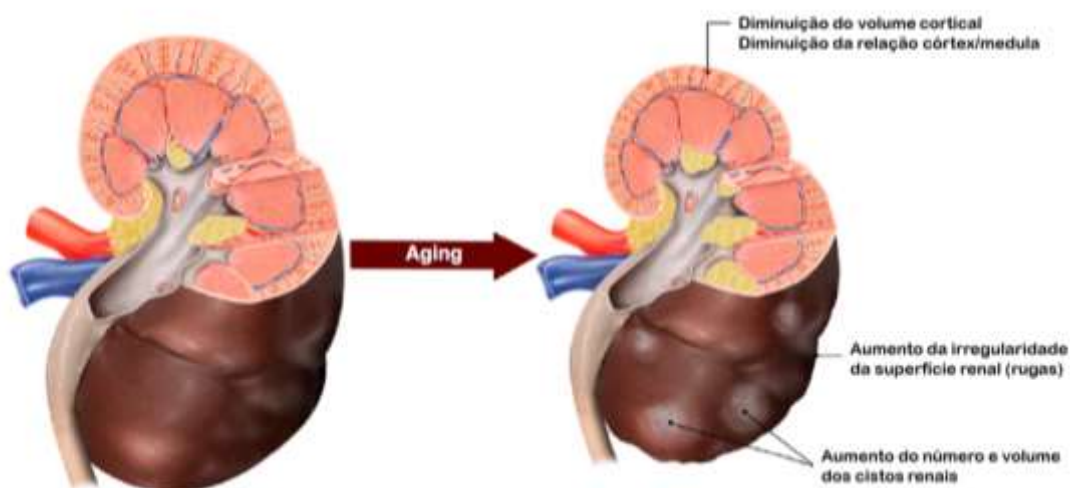


Figura 18. Alterações macroscópicas causadas pelo processo de envelhecimento saudável em rins humanos. Traduzido e adaptado de: Hommos et al., 2017.

A avaliação laboratorial dos rins é feita a partir dos achados encontrados no soro e na urina, e permite a identificação de importantes marcadores que objetivam a localização da alteração primária do sistema urinário. Nesse sentido, além da avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), o rim também pode ser avaliado por meio da dosagem de metabólitos que deveriam ser excretados. Assim, caso haja alguma alteração renal e o composto não seja eliminado, suas concentrações ficarão aumentadas no sangue pelo acúmulo (Sobamowo; Prabhakar, 2017; Meuten, 2017).

Os principais metabólitos usados para avaliação bioquímica da função renal são o nitrogênio ureico (ou ureia) e a creatinina. A ureia é produzida no fígado a partir da amônia e do bicarbonato, e é o principal meio de excreção do nitrogênio em animais. Já a creatinina provém da conversão de creatina e do fosfato de creatina nos músculos. Ambos são excretados pela urina, entretanto, caso isso não ocorra, haverá o aumento de suas concentrações plasmáticas, podendo levar ao aparecimento de sinais clínicos do acúmulo de toxinas nos pacientes, processo conhecido como uremia (Meuten, 2017; Silverthorn, 2017).

Cabe ressaltar que as alterações nos parâmetros renais (azotemia) podem não ter origem nos rins e nem sequer no sistema urinário, sendo classificadas em três tipos. Azotemia pré-renal, que ocorre na hipovolemia

(desidratação, choque). A azotemia renal, quando causada por lesões em um dos cinco componentes renais: glomérulo, túbulo, interstício, pelve renal ou vasos sanguíneos. E a azotemia pós-renal, que pode ser decorrente de obstrução em qualquer local após o néfron ou na ruptura de estruturas do sistema urinário (Muller, 2019).

No presente estudo, foram realizadas as mensurações séricas de nitrogênio ureico (ureia) e creatinina para análise da função renal em animais que consumiram nitrato inorgânico e solução placebo ao longo do tempo. Os resultados sugerem uma consonância com os demais dados bioquímicos deste trabalho, onde o tratamento com nitrato inorgânico a partir dos 15 meses de idade não foi responsável por alterações nas concentrações de ureia e creatinina quando comparado ao grupo que recebeu placebo na mesma faixa etária (Tabela 9). Tais resultados são evidentes mesmo dissociando os gêneros (Figuras 19-20).

Tabela 9: Concentrações séricas de creatinina e nitrogênio ureico (ureia) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2). Valores expressos em média \pm SEM.

GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
CREATININA (mg/dL)	Fêmea Placebo	0,86 \pm 0,16	0,67 \pm 0,03	0,61 \pm 0,03	0,65 \pm 0,09	0,56 \pm 0,06	0,52 \pm 0,09	0,49 \pm 0,09
	Fêmea Nitrato	0,88 \pm 0,11	0,79 \pm 0,08	0,68 \pm 0,02	0,60 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06	0,49 \pm 0,05	0,50 \pm 0,03
	Macho Placebo	0,80 \pm 0,12	0,71 \pm 0,09	0,69 \pm 0,08	0,59 \pm 0,07	0,56 \pm 0,08	0,54 \pm 0,02	0,48 \pm 0,07
	Macho Nitrato	0,57 \pm 0,04	0,71 \pm 0,08	0,54 \pm 0,03	0,56 \pm 0,13	0,58 \pm 0,08	0,44 \pm 0,09	0,47 \pm 0,26
GRUPOS		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
UREIA (mg/dL)	Fêmea Placebo	74,3 \pm 9,0	61,4 \pm 4,9	59,0 \pm 1,6	47,7 \pm 4,6	70,3 \pm 9,7	47,2 \pm 7,1	59,2 \pm 2,8
	Fêmea Nitrato	84,0 \pm 6,4	57,1 \pm 3,4	51,6 \pm 2,9	42,9 \pm 6,5	54,6 \pm 2,4	61,2 \pm 9,8	53,9 \pm 3,5
	Macho Placebo	55,0 \pm 8,5	54,8 \pm 2,1	69,2 \pm 12,3	55,9 \pm 4,8	56,4 \pm 5,3	35,5 \pm 2,6	52,4 \pm 2,5
	Macho Nitrato	43,6 \pm 4,4	66,6 \pm 5,9	53,1 \pm 2,4	58,3 \pm 6,5	70,6 \pm 12	48,9 \pm 5,5	55,3 \pm 3,4

Valores expressos em média \pm SEM. *p<0,05 NITRATO vs PLACEBO.

Frente a isso, os achados reafirmam o descrito por Melchiorretto e colaboradores (2016) ao avaliarem as concentrações séricas de ureia em animais de diferentes faixas etárias (de 3 meses até 24 meses), onde também não foi possível identificar diferença estatística ao longo do tempo. Porém, o mesmo estudo demonstra o aumento progressivo das concentrações de creatinina, especialmente a partir dos nove meses de idade, diferentemente dos achados deste trabalho, onde há uma redução progressiva e uniforme da creatinina ao longo do tempo (Figura 19).

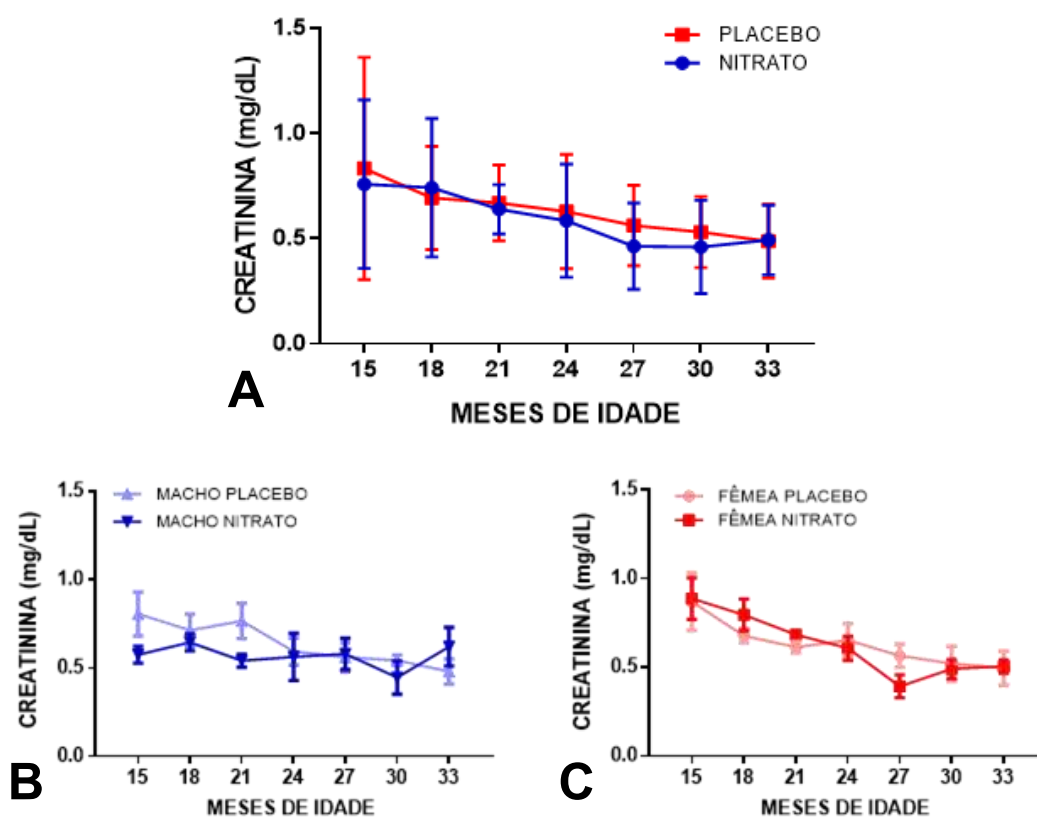


Figura 19. Concentrações séricas de creatinina em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

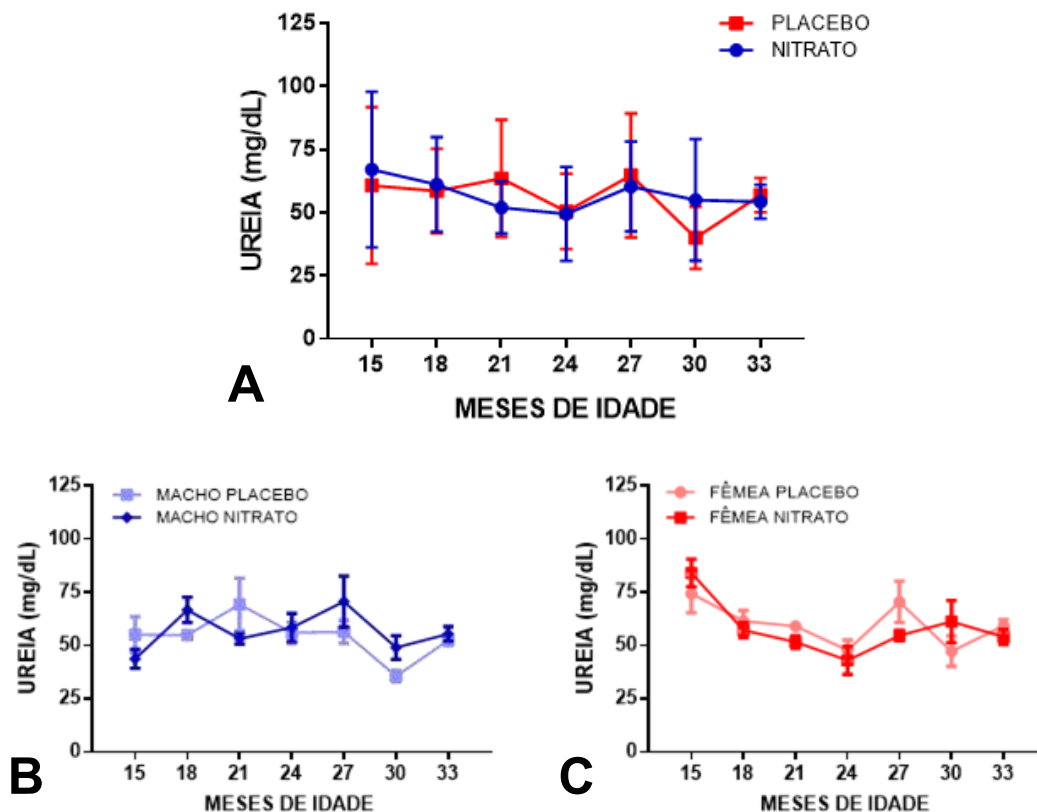


Figura 20. Concentrações séricas de nitrogênio ureico (ureia) em ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), machos (B) e fêmeas (C), a partir dos 15 meses de idade. Descrição do número de amostras pelo tempo de tratamento em anexo (Anexo 2).

Quanto ao tratamento com nitrato inorgânico, seus efeitos sobre o sistema urinário são escassos e controversos, como a relação do consumo de nitrato com o aumento risco de desenvolvimento de câncer nos rins de mulheres idosas descrita por Jones e colaboradores (2020) e a redução da pressão e da resistência renal refletindo em efeitos benéficos em pacientes com doença renal crônica, descrita por Kemmner e colaboradores (2017).

Nesse sentido, não existem trabalhos que evidenciem com detalhes os efeitos do nitrato inorgânico sobre a função renal, principalmente no que se refere ao consumo de nitrato por longos períodos e sua relação com o processo de envelhecimento renal e do organismo como um todo. Assim, os dados aqui expostos apresentam caráter inédito e descrevem a ausência de alterações funcionais e lesões causadas pelo consumo de nitrato inorgânico a longo prazo. Os resultados sugerem se tratar de uma intervenção com poucos riscos, todavia

os efeitos benéficos também não foram evidenciados, o que reforça a necessidade de mais estudos que avaliem o risco-benefício da via nitrato-nitrito-óxido nítrico sobre o sistema urinário ao longo do tempo.

4.4 Reatividade Vascular

O sistema cardiovascular apresenta um “controle fino e delicado” de suas funções, de modo a garantir o fluxo contínuo de entrega e remoção de substâncias entre o sangue e os tecidos periféricos. Para desenvolver tais funções, as paredes dos vasos sanguíneos são compostas por camadas de músculo liso, tecido conjuntivo fibroelástico e revestidas internamente por uma camada pavimentosa de células específicas chamada endotélio vascular (Silverthorn, 2017).

Durante muito tempo acreditou-se que, por conta do revestimento interno, as células endoteliais apenas serviam como barreira passiva entre o sangue e o interstício. No entanto, atualmente é conhecido que essas células têm importante papel na homeostase vascular, por meio da produção de mediadores autócrinos e parácrinos, como o óxido nítrico (NO). Além disso, as células endoteliais estão envolvidas em várias outras funções, incluindo modulação do tônus vascular (produção de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras), manutenção da fluidez do sangue, neovascularização e regulação da inflamação e resposta imune (Incalza et al., 2017).

Acerca da relação com a passagem do tempo, as funções e a morfologia dos componentes cardiovasculares são influenciadas negativamente pelo envelhecimento. Assim, o envelhecimento é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e alvo de diversas pesquisas no tocante a fisiopatologia cardiovascular (North; Sinclair, 2012; Paneni et al., 2017; Haybar et al., 2019).

O tempo de vida estimado das células endoteliais em adultos é de aproximadamente 30 anos, após esse período as células senescentes são substituídas por células jovens, porém menos funcionais (Bahia et al., 2006). Contudo, o acúmulo de células endoteliais senescentes também agrava a inflamação relacionada ao envelhecimento e a disfunção oxidativa e vascular, funcionando como uma alça de feedback. Detalhes desse processo estão

ilustrados na Figura 21 (Jia et al., 2019). Ademais, outras condições de saúde também podem interferir e acelerar o processo de disfunção endotelial, como a Covid-19 (Green, 2020).

Lakatta (2003) descreve as possíveis alterações aórticas causadas pelo envelhecimento em roedores, classificando as alterações em morfológicas e funcionais. Em relação a morfologia dos vasos sanguíneos afetados pelo tempo, podem ser destacadas as seguintes alterações: aumento do diâmetro, rigidez e espessura da parede do vaso, aumento do tamanho e redução do número de células musculares lisas e o aumento da deposição de colágeno e fibronectina com diminuição de elastina (calcificação e fragmentação).

No que se refere às funções vasculares, o envelhecimento é responsável por uma expressiva disfunção endotelial, caracterizada por: diminuição da disponibilidade de óxido nítrico e o aumento de espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peroxinitrito), aumento da permeabilidade vascular e expressão de molecular de adesão, diminuição da angiogênese, resposta exagerada a reparação vascular, entre outros (Lakatta et al., 2003).

Como demonstrado na Figura 21, os mecanismos oxidativos e inflamatórios com superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos vasos sanguíneos são um dos principais mediadores do processo de envelhecimento (Guzik; Touyz, 2017). Nesse aspecto, o consumo de substâncias com potencial antioxidante, como frutas, vegetais, grãos inteiros e nozes, é estimulado (Aune et al., 2019). Entre os alimentos disponíveis com potencial antioxidante encontram-se as folhas verdes escuras ricas em nitrato, com descrições de que o consumo *in natura* pode aumentar as concentrações séricas de nitrato e nitrito em menos de uma hora (Haun et al., 2016).

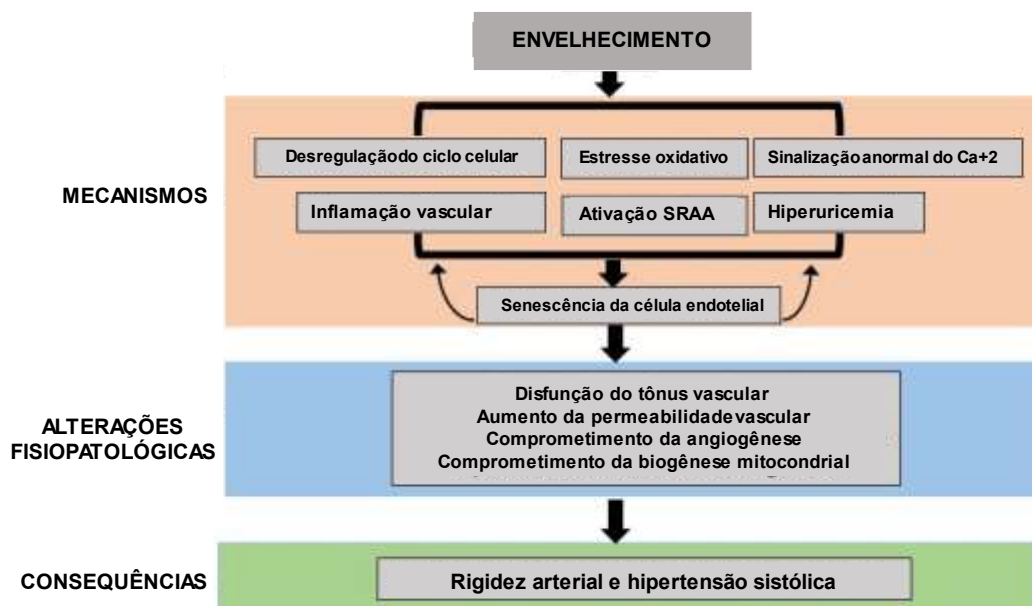


Figura 21. Efeitos do processo de envelhecimento sobre o sistema cardiovascular, suas alterações fisiopatológicas e consequências. Fonte: Traduzido e adaptado de Jia et al., 2019.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do envelhecimento associado ao consumo crônico de nitrato inorgânico sobre a reatividade vascular, segmentos da artéria mesentérica cranial de ratos Wistar idosos, tratados com nitrato inorgânico ou placebo, foram utilizados em sistema de banho de órgãos isolado.

Devido às especificações desta técnica e a grande variabilidade do tempo de vida total, os animais utilizados para a análise da reatividade vascular foram aqueles com indicação para eutanásia. Além disso, de modo a normalizar a faixa de idade em 27 e 33 meses, foram utilizados apenas animais que receberam as intervenções por mais de 12 meses e até 18 meses.

Os anéis formados por segmentos das artérias foram montados em sistemas de hastas, incubados em solução fisiológica e conectados ao sistema de registro (vide 3.6). Em seguida, foram acrescentadas ao sistema concentrações crescentes de soluções vasoconstritoras (Fenilefrina – FEN) e vasodilatadoras (Acetilcolina – ACH) e (Nitroprussiato de sódio – NPS), de modo a compor diferentes curvas dose-resposta.

Após o período de estabilização, os anéis foram submetidos aos testes de viabilidade do endotélio, onde foram divididos em dois grandes grupos: os animais que o endotélio funcional estava presente (> 60%), e aqueles onde não

havia endotélio funcional (<10%). Cabe ressaltar que o valor que classifica a presença de endotélio em animais idosos é diferente dos animais jovens, pois os idosos apresentam proporções diferentes de células endoteliais senescentes, caracterizadas pela maior fragilidade e menos funcionalidade, como descrito por Matz e Andriantsitohaina (2003).

Quanto aos protocolos experimentais, inicialmente, os anéis — com presença ou não de endotélio funcional —, foram incubados com soluções acumulativas de fenilefrina (FEN), com o objetivo de avaliar a eficiência da droga nos diferentes grupos, além da capacidade constritora dos anéis de animais idosos frente ao estímulo farmacológico. Os resultados estão expressos na Tabela 10 e Figuras 22-23.

Tabela 10: Valores (%) de E_{max} e de pD₂ referentes ao efeito constritor da FEN em anéis da artéria mesentérica cranial de animais idosos, de ambos os sexos, tratados cronicamente com nitrato inorgânico e solução placebo.

GÊNEROS COMBINADOS (n=16)	ENDOTÉLIO FUNCIONAL PRESENTE (FEN)		ENDOTÉLIO FUNCIONAL AUSENTE (FEN)	
	E _{max} ±SEM	pD ₂ ±SEM	E _{max} ±SEM	pD ₂ ±SEM
PLACEBO	100,01 ± 3,97	4,79 ± 0,71	99,95 ± 9,01	4,84 ± 0,06
NITRATO	74,45 ± 5,46**	4,88 ± 0,06	85,66 ± 8,37	5,21 ± 0,09**
GRUPOS (n=8)	ENDOTÉLIO FUNCIONAL PRESENTE (FEN)		ENDOTÉLIO FUNCIONAL AUSENTE (FEN)	
	E _{max} ±SEM	pD ₂ ±SEM	E _{max} ±SEM	pD ₂ ±SEM
FÊMEA PLACEBO	102,14 ± 4,64	4,77 ± 1,14	99,98 ± 12,63	4,97 ± 0,10
FÊMEA NITRATO	69,99 ± 8,78*	4,81 ± 0,16	79,00 ± 5,60	5,33 ± 0,13
MACHO PLACEBO	100,01 ± 6,79	4,82 ± 0,97	100,00 ± 13,74	4,82 ± 0,16
MACHO NITRATO	78,91 ± 6,73	4,96 ± 0,04	92,31 ± 16,12	5,12 ± 0,11

Valores expressos em média ± SEM. *p<0,05 **p<0,01 NITRATO vs PLACEBO.

Nos anéis com endotélio viável, os resultados demonstram que o consumo de nitrato crônico foi responsável por uma redução da capacidade constritora dos anéis diante do estímulo pela fenilefrina (Figura 22), além de diminuição do efeito máximo (E_{máx}: PLACEBO 100,01 ± 3,97 vs NITRATO 74,45 ± 5,46). No

entanto, não foram observadas alterações significativas no tocante à sensibilidade da droga (pD_2 : PLACEBO $4,79 \pm 0,71$ vs NITRATO $4,88 \pm 0,06$). Os mesmos resultados foram observados ao avaliar machos e fêmeas separadamente (Figuras 22B-C), destacando ainda um efeito do nitrato mais expressivo nas fêmeas (Tabela 10).

De forma contrária, nos anéis com ausência de endotélio funcional, as mesmas concentrações de FEN não foram responsáveis por diferenças relevantes entre os animais tratados com placebo e nitrato, mesmo ao dissociar o efeito do sexo (Figura 23), sugerindo se tratar de uma resposta dependente de endotélio funcional. Todavia, animais tratados com nitrato apresentaram maior sensibilidade a fenilefrina quando comparados aos tratados com solução placebo (pD_2 : PLACEBO $4,84 \pm 0,06$ vs NITRATO $5,21 \pm 0,09$)(Tabela 10).

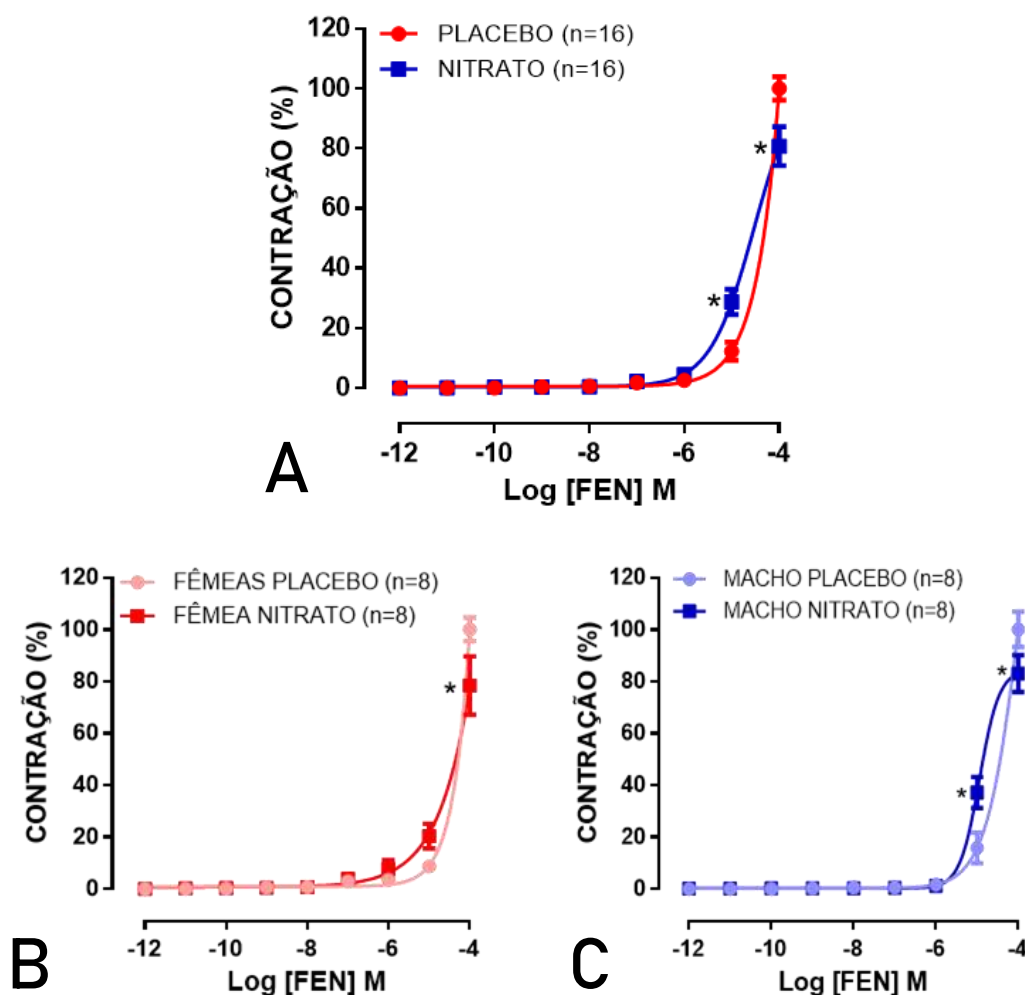


Figura 22. Curvas concentração-resposta para contração mediada pela FEN (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com endotélio funcional presente de ratos Wistar idosos

tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), fêmeas (B) e machos (C). * $p < 0,05$.

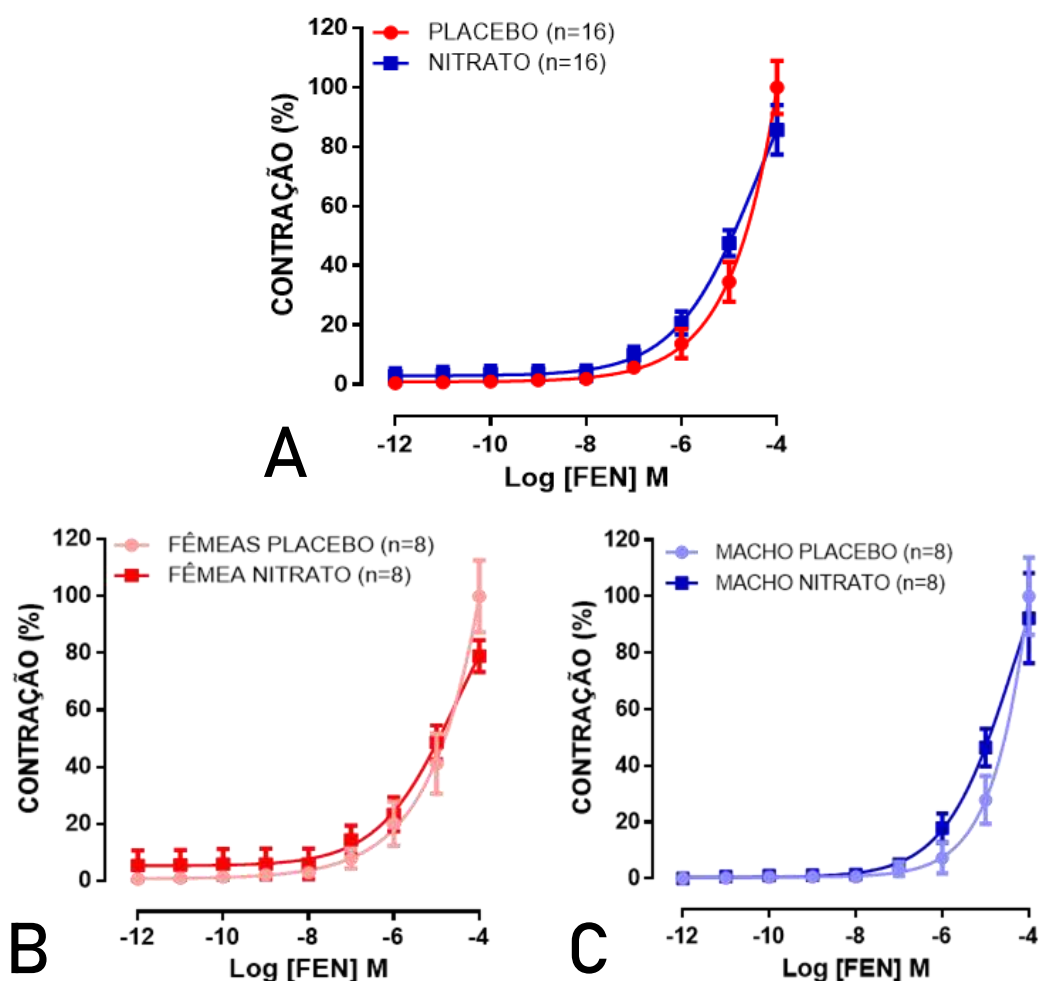


Figura 23. Curvas concentração-resposta para contração mediada pela FEN (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com a ausência de endotélio funcional, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), fêmeas (B) e machos (C). * $p < 0,05$.

Após a avaliação do efeito constritor mediado pela FEN, os anéis foram submetidos a concentrações acumulativas de substâncias vasodilatadoras de acordo com a presença de endotélio funcional. Desse modo, os anéis com endotélio viável foram incubados com concentrações crescentes de acetilcolina (ACH), enquanto os anéis com endotélio ausente, incubados com nitroprussiato de sódio (NPS) (Tabela 11).

Os dados demonstram que nos anéis com endotélio viável presente, os animais tratados cronicamente com nitrato inorgânico apresentaram maior

capacidade vasorelaxante em resposta à acetilcolina, quando comparados aos que consumiram solução placebo ($E_{m\acute{a}x}$: PLACEBO $80,04 \pm 3,69$ vs NITRATO $96,18 \pm 5,96$) (Figura 24A). Tais resultados também foram expressos ao dissociar o sexo (Figuras 24B-C). Ao avaliar a sensibilidade dos anéis à ACH, os animais tratados com nitrato inorgânico também obtiveram maior sensibilidade a droga, quando comparado aos suplementados com placebo (pD_2 : PLACEBO $5,38 \pm 0,08$ vs NITRATO $6,98 \pm 0,21$)(Tabela 11).

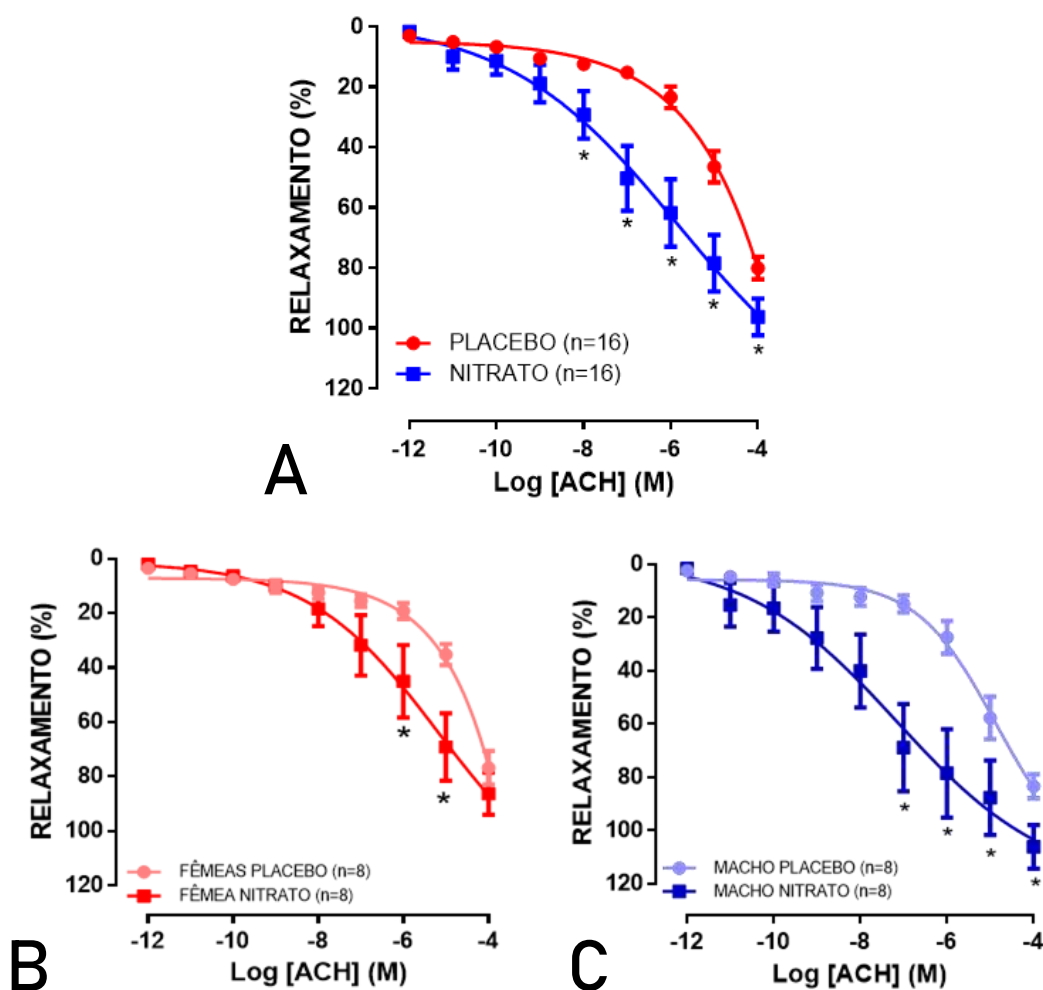


Figura 24. Curvas concentração-resposta para o relaxamento mediado pela ACH (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com endotélio funcional presente, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), fêmeas (B) e machos (C). * $p < 0,05$.

Diferente do avaliado em anéis com endotélio funcional presente, o consumo crônico de nitrato inorgânico não foi responsável por nenhuma

alteração frente ao efeito vasodilatador do nitroprussiato de sódio, protocolo realizado em anéis sem endotélio funcional ($E_{\text{máx}}$: PLACEBO $114,10 \pm 3,37$ vs NITRATO $113,00 \pm 2,38$) (Figura 25A). Resultados expressos tanto em fêmeas (Figura 25B) quanto em machos (Figura 25C). Por fim, também não houve diferenças significativas no tocante à sensibilidade dos anéis sem endotélio ao NPS (pD_2 : PLACEBO $6,61 \pm 0,12$ vs NITRATO $6,99 \pm 0,15$).

Esses achados corroboram o descrito por Luttrell e colaboradores (2020), onde não houve diferença ao comparar a resposta vasodilatadora ao NPS em anéis sem endotélio viável de animais jovens e idosos. Além disso, reforça a relação do processo de envelhecimento com a regulação da função vascular mediada pelas células endoteliais (Jia et al., 2019), e a hipótese de que o consumo crônico de nitrato inorgânico exerce efeito sobre a função vascular a partir de vias dependentes de endotélio.

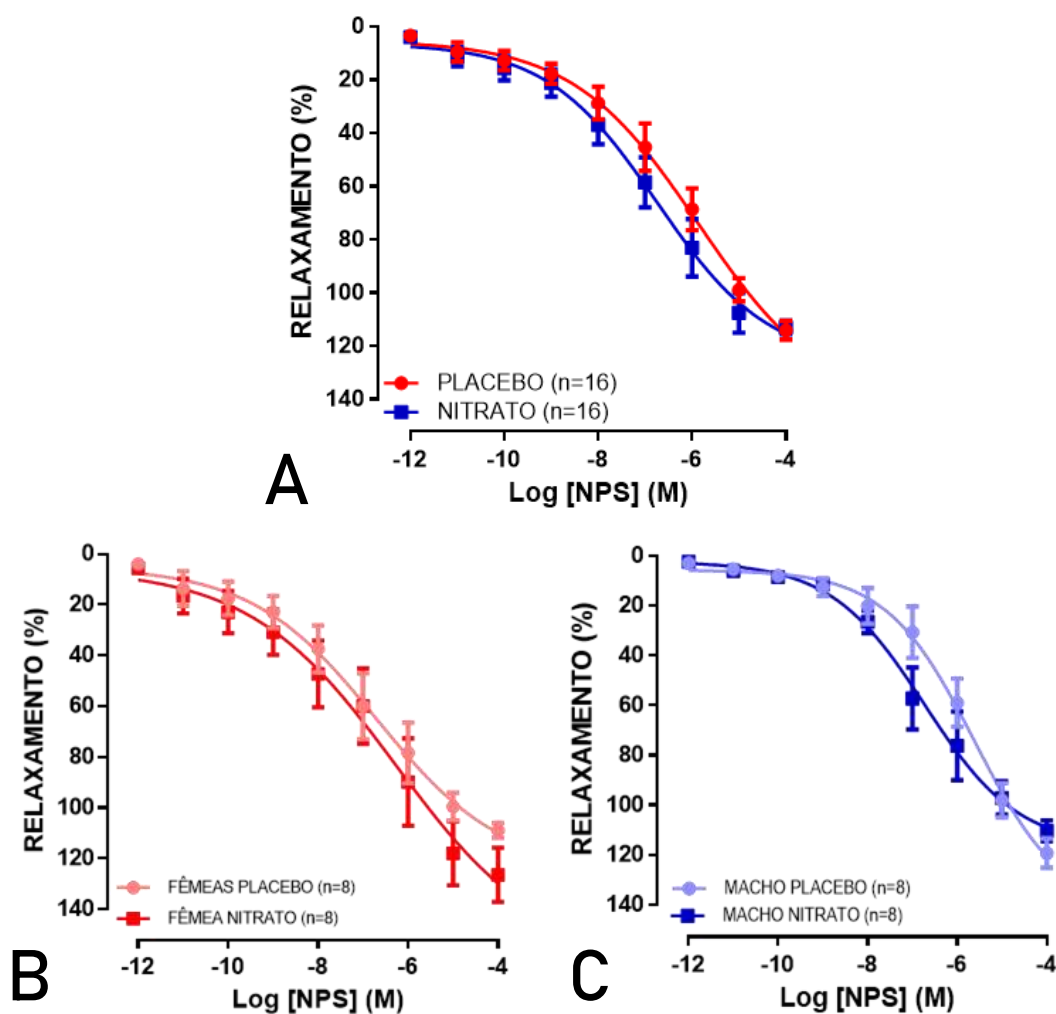


Figura 25. Curvas concentração-resposta para o relaxamento mediado pelo NPS (10^{-12} a 10^{-4} M), em anéis com a ausência de endotélio funcional presente, de ratos Wistar idosos tratados com nitrato inorgânico e solução placebo, gêneros combinados (A), fêmeas (B) e machos (C). * $p < 0,05$.

Tabela 11: Valores (%) de Emax e de pD2 referentes ao efeito vasorelaxante da ACH e NPS em anéis da artéria mesentérica cranial de animais idosos, de ambos os sexos, tratados cronicamente com nitrato inorgânico e solução placebo.

GÊNEROS COMBINADOS (n=16)	ENDOTÉLIO FUNCIONAL PRESENTE (ACH)		ENDOTÉLIO FUNCIONAL AUSENTE (NPS)	
	Emax±SEM	pD2±SEM	Emax±SEM	pD2±SEM
PLACEBO	80,04 ± 3,69	5,38 ± 0,08	114,10 ± 3,37	6,61 ± 0,12
NITRATO	96,18 ± 5,96*	6,98 ± 0,21**	113,00 ± 2,38	6,99 ± 0,15
GRUPOS (n=8)	ENDOTÉLIO FUNCIONAL PRESENTE (ACH)		ENDOTÉLIO FUNCIONAL AUSENTE (NPS)	
	Emax±SEM	pD2±SEM	Emax±SEM	pD2±SEM
FÊMEA PLACEBO	76,76 ± 6,03	5,11 ± 0,09	108,85 ± 2,82	7,22 ± 0,19
FÊMEA NITRATO	86,26 ± 7,61	6,34 ± 0,22*	115,91 ± 1,88	7,11 ± 0,25
MACHO PLACEBO	83,33 ± 4,35	5,59 ± 0,11	119,30 ± 5,75	6,10 ± 0,11
MACHO NITRATO	106,10 ± 8,13*	7,52 ± 0,31**	110,40 ± 4,06	6,89 ± 0,14

Valores expressos em média ± SEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ NITRATO vs PLACEBO.

Os resultados deste trabalho ratificam os efeitos vasorelaxantes dos nitratos amplamente descritos na literatura, sobretudo na presença de endotélio funcional (França-Silva et al., 2012; Bock et al., 2018). Ademais, as intervenções dietéticas com nitratos têm demonstrado diversos efeitos benéficos sobre outros aspectos da saúde cardiovascular (Larsen et al., 2006; Nossaman et al., 2010; Omar et al., 2016), principalmente devido ao seu potencial na diminuição e até reversão da disfunção endotelial (Bakker et al., 2016; Peng et al., 2020), o que justifica os efeitos positivos do consumo crônico de nitrato inorgânico sobre a atividade vascular de animais idosos.

No mesmo contexto, Rammos e colaboradores (2014) descrevem que a suplementação dietética com nitrato inorgânico melhora a disfunção endotelial e a rigidez vascular, além de reduzir a pressão arterial em idosos com risco

cardiovascular moderadamente aumentado, o que pode impedir ou atrasar o desenvolvimento de hipertensão e ter um impacto nas sequelas deletérias e resultado clínico em uma população em envelhecimento.

Além disso, Rammos e colaboradores (2015), ainda demonstram que a suplementação com nitrato em camundongos idosos é responsável por mudanças que ocorrem a nível de expressão gênica e perfil transcricional, modulando positivamente as vias relacionadas ao sistema de sinalização de cálcio, sistemas de desintoxicação celular e vias antioxidantes.

Porém, cabe ressaltar que a maioria dos relatos dos efeitos benéficos dos nitratos sobre a disfunção endotelial são a partir de experimentos onde a exposição aos nitratos foram realizadas por um tempo relativamente curto, com quatro, oito e dez semanas de duração (Ramos et al., 2014; Ramos et al., 2015; Bakker et al., 2016). Assim, este trabalho é o primeiro a descrever os efeitos crônicos do consumo de nitrato (mais de 12 meses - 52 semanas).

Com isso, os resultados inéditos deste trabalho atestam que mesmo com o consumo de nitrato por um longo período de tempo, os efeitos benéficos diante da disfunção endotelial em animais idosos ainda são perceptíveis. Ademais, não houve indícios de tolerância e/ou resistência ao tratamento, como também não foi possível identificar efeitos potencialmente danosos à função vascular.

4.5 Avaliação Histopatológica

Nas ciências médicas e da saúde, importantes informações são obtidas após a morte dos pacientes, ou seja, a partir do exame necroscópico. Tais informações são imprescindíveis para a elaboração dos atestados de óbito, pois além de enfatizarem a doença ou causa imediata do óbito, ainda reúnem dados sobre outras condições crônicas (contributivas ou subjacentes causas de morte), compondo os bancos epidemiológicos e de vigilância em saúde (Treuting et al., 2016).

Em estudos pré-clínicos, principalmente em modelos usando roedores, a determinação da causa da morte fornece informações translacionais valiosas que podem ser comparadas com a população humana. Tais informações são especialmente importantes em estudos que avaliem compostos tóxicos,

fenotipagem de novas cepas e em estudos de envelhecimento usando métodos para prolongar a expectativa de vida (Snyder et al., 2015).

No tocante às pesquisas sobre longevidade e envelhecimento, geralmente são utilizados dois tipos de design básicos: os estudos transversais (1), onde um “end point” é estipulado para eutanásia, necropsia e coleta de amostras dos indivíduos; e os estudos “end-of-life” ou em tradução livre, estudos de final da vida (2), onde o principal objetivo é a determinação do tempo de vida de forma natural. Neste último, os animais envelhecem até serem encontrados mortos ou são eutanasiados quando moribundos (Miller; Nadon, 2000).

O presente trabalho foi delineado na forma de estudo “end-of-life”, pois objetiva a avaliação dos efeitos do consumo de nitrato também sobre a expectativa de vida. Entretanto, a partir desse delineamento surgem considerações intrínsecas para determinação da causa da morte, como discutido por Manskikh (2014), em sua revisão sobre as definições de lesões fatais e incidentais e os problemas na determinação da causa da morte em animais de laboratório.

Segundo Manskink (2014), a certificação da morte foi e é um dos maiores problemas na área da patologia e anatomia patológica, sendo criado até um novo campo de estudo para esse fim, chamado “Tanatologia”, ou o estudo científico da morte. Ainda de acordo com o autor, se tratando de animais de laboratório, as dificuldades são ainda mais consideráveis, pois: (1) não existem referências patológicas tão precisas quanto em humanos; (2) os animais encontrados mortos nem sempre são viáveis para avaliação (autólise intensa); (3) na maioria das vezes não existem dados de suporte como histórico médico e exames diagnósticos; (4) em algumas condições as alterações teciduais causadas são mais discretas; e finalmente, (5) a morte natural pode ocorrer sem alterações morfológicas que levem a uma associação.

Diante de tais considerações, em muitos estudos com roedores que examinam o efeito do tratamento ou manipulação experimental na extensão da vida ou extensão da saúde, a causa da morte não é identificada e discutida. Dessa forma, mesmo com sua notável relevância, atualmente a determinação da causa da morte é considerada um tópico bastante controverso na experimentação científica usando roedores (Snyder et al., 2015; Snyder et al., 2019).

Neste trabalho, a higienização dos mini-isoladores com inspeção de todos os indivíduos foi realizada a cada dois dias, bem como exame clínico mais minucioso a cada sete dias, assim, foi possível rastrear a evolução das diferentes sintomatologias desenvolvidas. Entretanto, de forma frequente foram encontrados animais mortos em estado de autólise avançado. Sendo, portanto, inviáveis para avaliação histopatológica, tais indivíduos foram censurados da avaliação.

Para aqueles animais encontrados em condições adequadas e os que foram eutanasiados por estarem em estado moribundo (definição de estado moribundo disponível em: Snyder et al., 2015), o exame necroscópico completo foi realizado, seguido por fotodocumentação e coleta de amostras para análise histopatológica. Tais amostras foram encaminhadas para avaliação realizada exclusivamente por especialistas em patologia veterinária, no Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário (HV/CCA/UFPB).

Além dos sinais clínicos e achados macroscópicos na necropsia, os exames bioquímicos realizados periodicamente também deram suporte para a definição dos diagnósticos. No entanto, diante das dificuldades supracitadas envolvidas no diagnóstico da causa da morte de animais de laboratório, neste trabalho foi possível avaliar 45,5% das unidades experimentais propostas para a pesquisa. Quanto à intervenção, foram avaliados 46% dos animais que consumiram nitrato inorgânico (28% fêmeas e 18% machos) e 45% dos indivíduos que receberam solução placebo (25% fêmeas e 20% machos).

Os resultados foram organizados de acordo com o grupo experimental e o sistema orgânico envolvido. E, com base nos mesmos, não foi possível identificar relações entre o consumo de nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) e o desenvolvimento espontâneo de doenças em animais idosos. Contudo, ao dissociar os grupos de acordo com o gênero foi possível descrever diferenças consideráveis entre machos e fêmeas (Tabelas 12-13).

Em relação ao diagnóstico de alterações neoplásicas, a incidência de tumores espontâneos em fêmeas (13,5%) foi significativamente maior do que em machos (4,5%), o que representa um risco relativo 5,3 vezes maior de desenvolvimento de neoplasias nas fêmeas do que nos machos (valores que independem do tratamento) (Tabela 12). A maior incidência de tumores em fêmeas é amplamente descrita na literatura, inclusive em estudos que avaliam o

desenvolvimento espontâneo de condições patológicas em animais de laboratório (Walsh et al., 1994; Poteracky et al., 1998; Carlus et al., 2013).

Tabela 12: Descrição das alterações neoplásicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte.

Neoplasias	PLACEBO	NITRATO	PLACEBO	NITRATO
	♀	♀	♂	♂
Fibroma	3	4	1	2
Fibrossarcoma	3	3	1	
Leiomioma cístico	1		1	1
Fibroadenoma mamário	2	1		
Hemangiossarcoma	1		1	
Adenocarcinoma pancreático		1		
Mixoma		1		
Lipoma	2	2		2
Adenocarcinoma uterino	1	1		
Tumor de células da granulosa		1		
TOTAL	13	14	4	5

Ainda nesse âmbito, é sabido que a senescência celular, oriunda do processo de envelhecimento, desempenha papéis importantes em diferentes fases da carcinogênese (iniciação, promoção, conversão e progressão), configurando o tempo de vida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de alterações neoplásicas (Calcinotto et al., 2019).

Todavia, cabe ressaltar que a incidência das neoplasias varia consideravelmente de acordo com a faixa etária avaliada. Por exemplo, Carlus e colaboradores (2013), ao avaliarem roedores com mais de 24 meses de idade, descrevem uma incidência de neoplasmas espontâneos de 89% nas fêmeas e 72% nos machos, diferentemente dos resultados de Trotte e colaboradores (2008), que relatam a incidência de apenas 1,8% de neoplasias com desenvolvimento espontâneo em ratos com 18 meses de idade.

Quanto à localização e origem celular das alterações tumorais, a maioria foi encontrada próximo às camadas musculares superficiais que revestem a cavidade torácica e abdominal, apresentando formato circular/cilíndrico com superfície lisa recoberta pela epiderme. Foram identificados a partir da avaliação histopatológica principalmente tumores mesenquimais com origem nas células fibroblásticas do tecido conjuntivo (Figura 26), assim como o acometimento do tecido mamário e adiposo (Figura 27). Resultados que diferem dos estudos de

Carlus e colaboradores (2013) e Poteracky e colaboradores (1998), que relatam maior prevalência de neoplasias com origem no tecido endócrino, sobretudo o adenoma de hipófise.

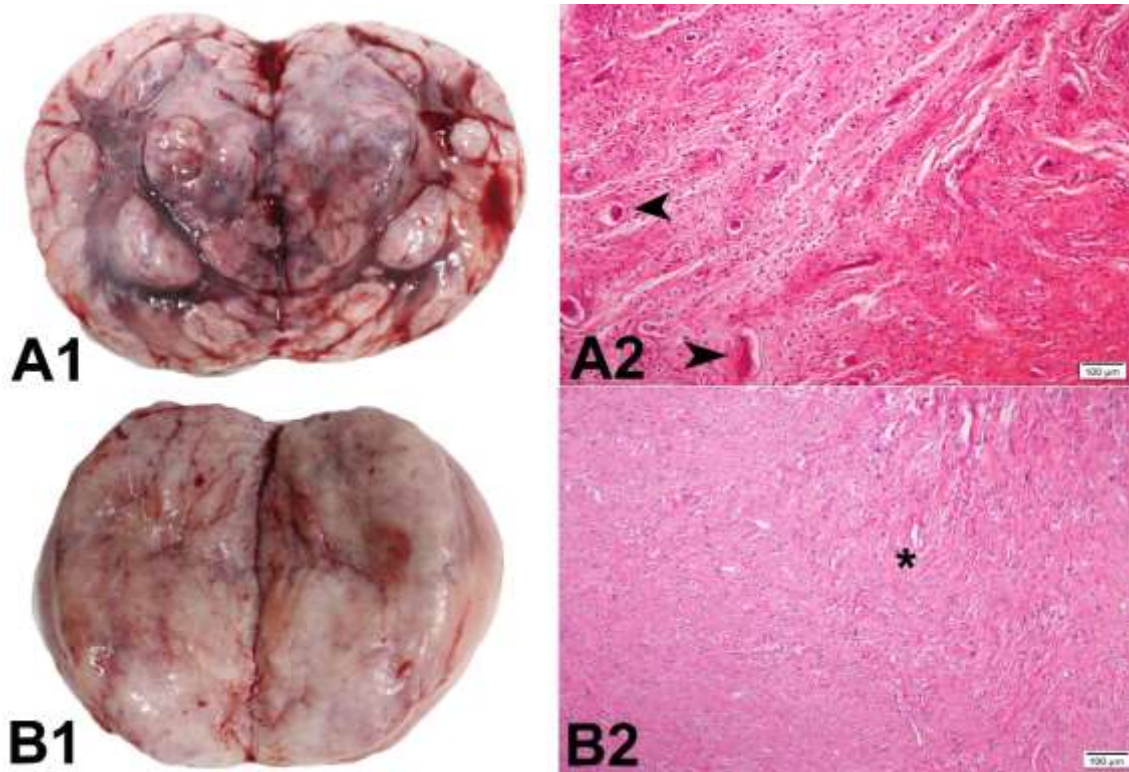


Figura 26. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar idosos. (A1) Massa neoplásica encapsulada (75g), sensível a palpação, localizada na região inguinal sem aderências. (A2) Fotomicrografia da região central do neoplasma A1, com evidente crescimento atípico do tecido conjuntivo altamente vascularizado (ponta de seta), presença de fibroblastos com alterações nucleares diversas, além de pleomorfismo e anisocitose severos, que caracterizam o fibrossarcoma (HE, obj. 10x). (B1) Massa neoplásica encapsulada de consistência firme (79,8g), localizada na região torácica esquerda sem aderências. (B2) Fotomicrografia da região central do neoplasma B1 com evidente acometimento do tecido conjuntivo, no entanto, pouca celularidade, pleomorfismo e anisocitose leves caracterizando o fibroma (HE, obj. 10x).

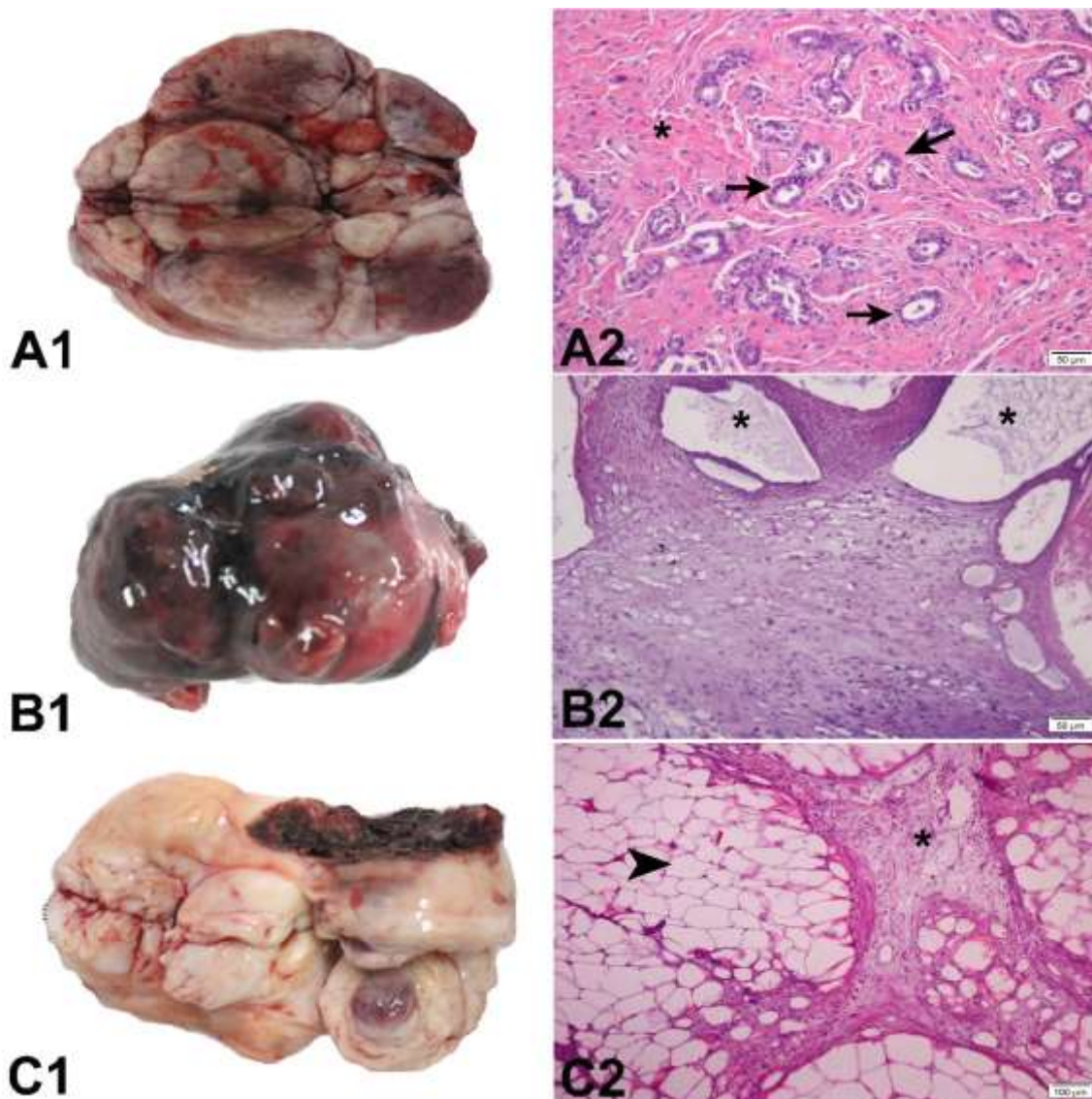


Figura 27. Neoplasias espontâneas em ratos Wistar idosos. (A1) Massa neoplásica multinodular (114,2g), sensível a palpação, localizada na região cervical direita sem aderências. (A2) Fotomicrografia da região central do neoplasma A1, com evidente crescimento atípico do tecido conjuntivo (*) e presença de tecido glandular mamário (setas), caracterizando o fibroadenoma mamário (HE, obj. 20x). (B1) Massa neoplásica multinodular de consistência firme, localizada na cavidade abdominal próximo ao sistema genitourinário, sem aderências. (B2) Fotomicrografia da região central do neoplasma B1 com presença de crescimento atípico do tecido conjuntivo e formação de cistos cm conteúdo (*) caracterizando o leiomioma cístico (HE, obj. 20x). (C1) Massa neoplásica encapsulada de aspecto flácido (87g), localizada na região abdominal esquerda. (C2) Fotomicrografia da região central do neoplasma C1, apresentando crescimento atípico de adipócitos, bem diferenciados (ponta de seta), com áreas de necrose de adipócitos, envolvidos por tecido conjuntivo (*), diagnóstico lipoma (HE, obj. 10x).

No que se refere às demais alterações patológicas, os resultados foram divididos de acordo com o sistema acometido (Tabela 13). Entretanto, cabe ressaltar que algumas patologias apresentam alterações multissistêmicas e a relação entre elas pode influenciar diretamente a causa da morte do indivíduo, dificultando o processo de diagnóstico (Manskikh, 2014).

Tabela 13: Alterações patológicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte.

	PLACEBO ♀	NITRATO ♀	PLACEBO ♂	NITRATO ♂
Sistema neurológico				
Head tilt		1	2	1
Encefalopatia urêmica	1	1	2	3
Sistema urinário				
Rim em estágio terminal	2	1	3	4
Rins policísticos		1		
Sistema digestório				
Alterações dentárias	1	1	4	3
Lipidose hepática	3	3	4	5
Sistema respiratório				
Pneumonia granulomatosa	4	2	4	3
Pneumopatia urêmica	1		2	2
Enfisema pulmonar		2	1	
Sistema tegumentar				
Alopecia	6	5	3	4
Lesões ulcerativas	2	1	1	3
Sistema reprodutor				
Ovários policísticos	2	1		
Piometra / Mucometra	4	2		
Endometrite	1			
TOTAL	27	21	26	28

No tocante às alterações no sistema nervoso, houve um acometimento mais expressivo em animais do sexo masculino (4%) quando comparados às fêmeas (1,5%), independente do tratamento com nitrato inorgânico. Nesse âmbito, é sabido que a degeneração do tecido nervoso pelo tempo (senescência) é algo amplamente descrito na literatura, sendo inclusive relacionada com a patogenia de condições como a doença de Alzheimer e de Parkinson (Wyss-Coray, 2016; Lane et al., 2018; Reich; Svitt, 2019).

Neste trabalho, alguns indivíduos com acometimento do sistema nervoso apresentaram alterações motoras significativas como: relutância ao movimento, apatia, inapetência e andar em círculos, progressivamente evoluindo para

paraplegia, anorexia e morte. Nestes mesmos animais, os exames bioquímicos periódicos demonstraram um aumento relevante dos indicadores da função renal (ureia, creatinina), e ao exame necroscópico, nenhuma alteração macroscópica foi identificada. Dessa forma, para melhor investigação, foram coletadas amostras de cérebro, cerebelo e medula espinhal, e submetidas ao processamento para confecção de lâminas histológicas.

Ao analisar microscopicamente as amostras dos animais com sintomatologia nervosa foi possível identificar a presença de diversos vacúolos, distribuídos de forma difusa e localizados principalmente na substância branca das diferentes regiões sistema nervoso central. Esta vacuolização progressiva leva à degeneração do tecido nervoso, processo chamado de “status spongiosus” (Figura 28A) (Ferrer; Vidal, 2020).

Além dos achados nas amostras de tecido nervoso, outros tecidos foram avaliados como pulmão, rins e fígado. Tal avaliação permitiu a identificação de lesões renais graves, histopatologicamente descritas como: presença de cilindros proteicos intratubulares, perda de células tubulares, ectasia tubular, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomeruloesclerose e fibrose. Esses achados corroboram os resultados dos testes bioquímicos e caracterizam o rim em estágio terminal (Figura 28B), funcionalmente diagnosticado com insuficiência renal crônica (Zachary, 2018).

Ao associar as alterações renais graves com a sintomatologia nervosa, o diagnóstico de encefalopatia urêmica foi proposto. Nesta condição a incapacidade do rim de excretar toxinas endógenas e exógenas (por exemplo, compostos de guanidina) resulta em neurotoxicidade grave (degeneração esponjosa), lesão na barreira hematoencefálica, alterações isquêmicas/microvasculares, neuroinflamação, aumento do estresse oxidativo central, além de disfunção no metabolismo e vascularização do sistema nervoso central (Hamed, 2019).

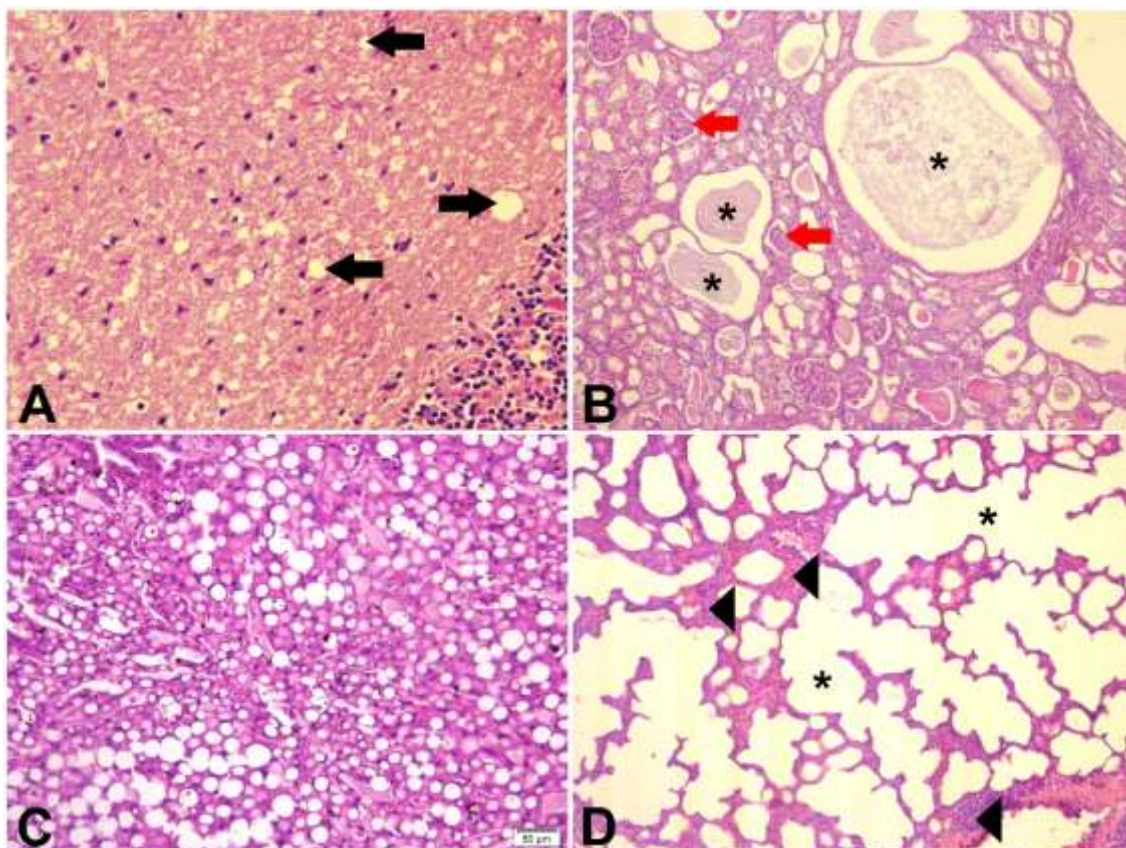


Figura 28. Alterações histopatológicas identificadas em ratos Wistar machos e fêmeas, submetidos ao tratamento com nitrato inorgânico e placebo, a partir dos 15 meses de idade até a morte. (A) *Status spongiosus* - Presença de vacúolos difusos (seta preta) na substância branca do cerebelo (HE, obj 20x). (B) Rim em estágio terminal - Fotomicrografia da região cortical do rim, com presença de cilindros proteicos intratubulares, perda de células tubulares, ectasia tubular (*), glomeruloesclerose (seta vermelha) e fibrose (HE, obj 10x). (C) Lipidose hepática - Acúmulo difuso de glóbulos de gordura no interior dos hepatócitos (HE, obj 20x). (D) Enfisema pulmonar e pneumonia granulomatosa – Fotomicrografia do pulmão com evidente distensão dos alvéolos (*) e presença de infiltrado inflamatório mononuclear com presença de células gigantes multinucleadas (ponta de seta) (HE, obj 20x).

Quanto às alterações do sistema digestório, os distúrbios hepáticos apresentaram grande incidência (7,5%), mesmo diante da notável resiliência do tecido hepático para com o processo de envelhecimento (Hunt et al., 2019). Tais alterações estão relacionadas com a incapacidade do fígado de realizar suas funções com o passar do tempo, o que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças hepáticas e sistêmicas (Pibiri et al., 2018).

A maioria dos animais com alterações hepáticas apresentavam sobrepeso, acúmulo exacerbado de tecido adiposo na cavidade abdominal e

alterações bioquímicas nos marcadores de lesão e função hepática. Durante o exame necroscópico foi possível identificar o fígado aumentado de volume (hepatomegalia), além de apresentar coloração amarelada, aspecto friável e esponjoso, com bordas arredondadas.

Com a avaliação microscópica, identificou-se a presença difusa de vacúolos contendo triglicerídeos e outros metabólitos lipídicos, como gorduras neutras e colesterol no interior dos hepatócitos, caracterizando a lipidose hepática (Figura 28C). Tanto em animais, quanto em humanos, o acúmulo de lipídeos no fígado (lipidose/esteatose hepática) é uma condição mais frequente quando há mobilização dos estoques de gordura corporal, como por exemplo, na gestação e lactação. No entanto, também é observada em desequilíbrios metabólicos, como a obesidade, e na disfunção hepática oriunda do envelhecimento, ambas identificadas neste trabalho.

Em relação aos efeitos do nitrato, Cordero-Herrera e colaboradores (2019) demonstraram que o consumo de nitrato/nitrito a curto prazo (7 semanas), previne o acúmulo de gordura no fígado em modelo de lipidose induzida por dieta em roedores, e modelo com cultivo de células hepáticas humanas. Os autores concluíram ainda que o nitrato dietético atenua o estresse oxidativo e preserva a atividade da AMPK hepática, com efeitos na função cardiovascular e metabólica. Entretanto, neste trabalho, o consumo crônico de nitrato inorgânico não foi responsável por alterações na incidência e progressão da esteatose hepática em idosos.

Ainda sobre o sistema digestório, um aspecto específico sobre a fisiologia do envelhecimento nos roedores é a arcada dentária, especialmente os dentes incisivos, que são classificados como hipsodontes, significativamente maiores, além de apresentarem composição histológica peculiar, crescimento contínuo e necessidade de desgaste periódico. Em animais idosos, a ineficiência desse desgaste pode causar o crescimento exacerbado e lateralizado dos dentes incisivos, podendo acarretar casos leves de dores e dificuldade na obtenção do alimento, e casos graves de lesões na região da cabeça e pescoço e inapetência (Konig; Liebich, 2016).

Neste trabalho, a incidência das alterações dentárias espontâneas foi de 4,5%. Sem a correta intervenção, os quadros evoluem para inanição, anorexia e morte. Isto sinaliza para a maior atenção no cuidado e manejo de roedores em

laboratório, especialmente animais longevos. Quanto ao tratamento, a cavidade oral exerce grande influência sobre via nitrato-nitrito-óxido nítrico, mas não foram identificadas alterações quanto ao consumo de nitrato inorgânico no que se refere às alterações dentárias e da cavidade oral.

No tocante ao sistema respiratório, as alterações patológicas representaram 23,7% dos diagnósticos totais. Nesse sentido, é sabido que o processo de envelhecimento está associado a mudanças moleculares e fisiológicas nos pulmões. A título de exemplo, alterações diretas na composição celular e na função pulmonar, diminuição da remodelação e capacidade regenerativa, e o aumento da suscetibilidade a doenças pulmonares agudas e crônicas (Cho; Stout-Delgado, 2019).

O efeito do tempo também é responsável por mudanças no perfil imunológico do sistema respiratório, processo chamado de imunossenescência (Barbé-Tuana et al., 2020). Essa deterioração progressiva dos componentes imunológicos no tecido pulmonar é resultado de um desequilíbrio entre os mecanismos inflamatórios e antiinflamatórios. Pois ao passo que a estimulação crônica de antígenos ao longo da vida e o maior dano oxidativo aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias (inflammaging), há uma redução progressiva dos componentes celulares e, como consequente, da resposta anti-inflamatória e antioxidante (Brandenberger; Muhlfeld, 2017; Franceschi et al., 2018).

No presente estudo, os indivíduos acometidos com distúrbios respiratórios apresentaram dispneia progressiva, relutância ao movimento, apatia e, em casos graves, ruídos respiratórios e apneia seguida de morte. Durante a necropsia, poucas alterações macroscópicas no parênquima pulmonar foram identificadas. Todavia, em animais com grave sintomatologia respiratória, os pulmões apresentaram formações multinodulares difusas, com conteúdo purulento, distribuídas por até mais da metade do parênquima pulmonar.

A partir da avaliação histopatológica do sistema respiratório, a descrição de diferentes alterações patológicas foi realizada (Tabela 13). Em alguns animais o lúmen dos alvéolos encontrava-se repleto de material eosinofílico amorfo, o que caracteriza edema pulmonar. Em amostras de outros animais, o enfisema pulmonar foi identificado, a partir da presença da distensão grave dos alvéolos pulmonares, com redução da superfície de troca gasosa (Figura 28D).

Ainda nesse âmbito, outra patologia respiratória detectada foi a pneumonia granulomatosa, que se caracteriza macroscopicamente pela formação de múltiplos nódulos dispersos irregularmente ao longo do parênquima pulmonar, repletos de secreção caseosa e infiltrado inflamatório, mononuclear com presença de células gigantes multinucleadas (Figura 28D). Tais achados, somados aos quadros de dificuldade respiratória sugerem se tratar de quadros infecciosos, porém o agente etiológico não foi identificado.

As alterações pulmonares, desde os casos leves de edema e enfisema, até a pneumonia granulomatosa grave, podem estar relacionadas com as alterações do envelhecimento pulmonar já mencionadas, como o aumento da susceptibilidade a infecções, redução da função e capacidade regenerativa e comprometimento do sistema imunológico (Cho; Stout-Delgado, 2019).

Por fim, não foi possível estabelecer relações entre o consumo de nitrato inorgânico e diferenças na incidência de doenças respiratórias. As demais condições patológicas e alterações nos sistemas orgânicos identificadas encontram-se na Tabela 13, de acordo com o grupo experimental.

Em conclusão, os resultados deste trabalho, sugerem que o consumo suplementar de nitrato inorgânico (NaNO_3 10mM) por um longo período de tempo não exerce influência sobre o desenvolvimento e progressão de doenças em animais idosos, independente do sexo. No entanto, mais estudos sobre o consumo crônico de nitratos e as patologias dependentes da idade, são necessários.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

A suplementação com nitrato inorgânico por longos períodos, realizada pela água de beber (NaNO_3 10mM), foi responsável por uma ingestão média de aproximadamente 100mg/kg/dia desse sal. O consumo crônico — a partir dos 15 meses de idade até a morte natural — não exerceu influência sobre a longevidade e tempo de vida médio de ratos Wistar, independentemente do sexo.

O tratamento continuado promoveu melhora na reatividade vascular dependente de endotélio funcional, assim como ganho nas respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras. Tal achado sugere uma possível ação benéfica sobre a disfunção endotelial em animais idosos, de ambos os sexos. Também não houve indícios de tolerância e/ou resistência ao tratamento, bem como de efeitos potencialmente danosos à função vascular.

O processo de envelhecimento induziu alterações bioquímicas expressivas, sobretudo a partir dos 27 meses de idade. Todavia, o consumo de nitrato não foi relacionado com alterações nos parâmetros que avaliaram o estresse oxidativo, função renal, lesão hepática e perfil lipídico. Sinais de intoxicação ou disfunções relacionadas ao tratamento também não foram encontradas.

A suplementação crônica com nitrato inorgânico não se mostrou diretamente associada a nenhuma das condições patológicas envolvidas com a causa da morte dos indivíduos. Do mesmo modo, a progressão das doenças e seus efeitos fisiopatológicos não foram influenciados pela intervenção. Entretanto, foram descritas diferenças significativas quanto à causa da morte entre machos e fêmeas.

Os resultados contribuem para o conhecimento existente acerca dos efeitos benéficos do consumo de alimentos ricos em nitrato, além de sugerir se tratar de uma suplementação segura e eficiente a longo prazo, com resultados positivos principalmente sobre a saúde cardiovascular. No mais, os dados apoiam o estímulo às abordagens nutricionais como estratégia complementar na modulação das mudanças funcionais relacionadas à idade e destacam a influência do gênero e suas particularidades sobre o processo de envelhecimento.

Referências

REFERÊNCIAS

ABIRI, B.; VAFA, M. Dietary restriction, cardiovascular aging and age-related cardiovascular diseases: a review of the evidence. Cap. 7 In: GUEST, P. C. **Reviews on biomarker studies in aging and anti-aging research**. 1 ed. Campinas: Springer, 2019. p. 1-279.

ALESCO – Research for life. Racks Ventiladas Alesco – Rack Ventilife para ratos. **Tabela de medidas e catálogo de produtos**, p. 6, 2020. Disponível em: <https://www.alesco.com.br/racks-ventilados>;

ALLISON, R. W. Avaliação laboratorial da função hepática. *In*: Thrall M. A. (org.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p.1698 -1705, Dec 1970.

ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 25, n. 1, p. 49-51, Mar 2012.

APARICIO, R.; RANA, A.; WALKER, D. W. Upregulation of the Autophagy Adaptor p62/SQSTM1 Prolongs Health and Lifespan in Middle-Aged Drosophila. **Cell Reports**, v. 28, n. 4, p. 1029-1040, Jul 2019.

ASHOR, A. W.; CHOWDHURY, S.; OGGIONI, C.; et al. Inorganic Nitrate Supplementation in Young and Old Obese Adults Does Not Affect Acute Glucose and Insulin Responses but Lowers Oxidative Stress. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 11, p. 2224-2232, Nov 2016.

AUNE, D. Plant Foods, Antioxidant Biomarkers, and the Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality: A Review of the Evidence. **Advances in Nutrition**, v. 10, p. 404-421, Nov 2019.

AUSTAD, S. N.; FISCHER, K. E. Sex differences in lifespan. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1022-1033, Jun 2014.

AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, v. 20, n. 6, p. 763-782, Dec 2019.

BAATI, T.; BOURASSET, F.; GHARBI, N.; et al. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene. **Biomaterials**, v. 33, n. 19, p. 4936-4946, Jun 2012.

BAEK, J. H.; ZHANG, X.; WILLIAMNS, M. C.; et al. Sodium nitrite potentiates renal oxidative stress and injury in hemoglobin exposed guinea pigs. **Toxicology**, v. 333, p. 89-99, Jul 2015.

BAHIA, L.; AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; et al. The endothelium in the metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 291-303, Apr 2006.

BAKKER, J .R.; BONDONNO, N. P.; GASPARI, T. A.; et al. Low dose dietary nitrate improves endothelial dysfunction and plaque stability in the ApoE -/- mouse fed a high fat diet. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 189-198, Oct 2016.

BARBÉ-TUANA, F.; FUNCHAL, G.; SCHMITZ, C. R. R.; et al. The interplay between immunosenescence and age-related diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 5, 545-557, Oct 2020.

BARTOLONE, S. N.; WARD, E. P.; WANG, Z.; et al. Micturition defects and altered bladder function in the klotho mutant mouse model of aging. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 8, n. 3, p. 81-92, Jun 2020.

BEDALE, W.; SINDELAR, J. J.; MILKOWSKI, A. L. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. **Meat Science**, v. 120, p. 85-92, Oct 2016.

BEGG, D. P. Disturbances of thirst and fluid balance associated with aging. **Physiology & Behavior**, v. 178, p. 28-34, Sep 2017.

BEIN, M.A.; UNLUCAN, D.; OLOWU, G.; KALIFA, W. Healthcare spending and health Octcomes: evidence from selected East African countries. **Afr Health Sci**, v. 17, n. 1, p. 247–254, Mar 2017.

BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F., DOUGALL, H.; et al. Stomach NO synthesis. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 502, Apr 1994.

BINKERD, E. F.; KOLARI, O. E. The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 13, n. 6, p. 655–661, Dec 1975.

BITTO, A.; ITO, T. K.; PINEDA, V. V.; et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. **eLIFE**, v. 5, p. 1-17, Aug 2016.

BOCK, J. M.; TREICHLER, D. P.; NORTON, S. L.; et al. Inorganic nitrate supplementation enhances functional capacity and lower-limb microvascular reactivity in patients with peripheral artery disease. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 45-51, Nov 2018.

BONDONNO, C. P.; BLEKKENHORST, L. C.; PRINCE, R. L.; et al. Association of vegetable nitrate intake with carotid atherosclerosis and ischemic

cerebrovascular disease in older women. **Stroke**, v. 48, n. 7, p. 1724-1729, Jul 2017.

BOOTH, J. L.; UMSTEAD, T. M.; HU, S.; et al. Housing Conditions Modulate the Severity of *Mycoplasma pulmonis* Infection in Mice Deficient in Class A Scavenger Receptor. **Comparative Medicine**, v. 64, n. 6, p. 424-439, Dec 2014.

BOTELHO, F.; SILVA, C.; CRUZ, F. Epidemiology Explained - Survival Analysis. **Acta Urológica**, v. 26, n. 4, p. 33-38, Aug 2009.

BOUAZIZ-KETATA, H.; SALAH, G. B.; SALAH, H. B.; et al. Nitrate-induced Biochemical and Histopathological Changes in the Liver of Rats: Ameliorative Effect of *Hyparrhenia hirta*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, n. 9, p. 695-706, Sep 2014.

BRANDENBERGER, C.; MUHLFELD, C. Mechanisms of lung aging. **Cell and Tissue Research**, v. 367, n. 3, p. 469-480, Mar 2017.

BRKIĆ, D.; BOŠNIR, J.; BEVARDI, M. Nitrate in leafy green vegetables and estimated intake. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 3, p. 31-41, Mar 2017.

BROOKS-WILSON, A. R. Genetics of healthy aging and longevity. **Human Genetics**, v. 132, p. 1323-1338, Aug 2013.

BRYAN, N. S.; TRIBBLE, G.; ANGELOV, N. Oral microbiome and nitric oxide: the missing link in the management of blood pressure. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 4, p. 1-8, Apr 2017.

BUETTNER, D.; SKEMP, S. Blue zones: Lessons from the world's longest lived. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 10, n. 5, p. 318–21, Jul 2016.

BUTLER, A. R.; FEELISCH, M. Therapeutic uses of inorganic nitrite and nitrate: From the past to the future. **Circulation**, v. 117, n. 16, p. 2151–2159, Apr 2008.

CALCINOTTO, A.; KOHLI, J.; ZAGATO, E.; et al. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1047-1078, Apr 2019.

CALLAGHAN, N. J.; FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. **Biological Procedures Online**, v. 13, n. 3, p. 1-10, Jan 2011.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica dos mamíferos – Animais de laboratório e espécies variadas. In: Thrall M. A. (org.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

CARLSTROM, M.; LARSEN, F. J.; NYSTRÖM, T.; et al., Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 41, p. 17716–17720, Oct 2010.

CARLSTROM, M.; MONTENEGRO, M. F. Therapeutic value of stimulating the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway to attenuate oxidative stress and restore nitric oxide bioavailability in cardiorenal disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 285, n. 1, p. 2-18, Jan 2019.

CARLSTROM, M.; PERSSON, A. R. G.; LARSSON, E.; et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 3, p. 574-585, Nov 2011.

CARLUS, M.; ELIES, L.; FOUQUE, M-C.; et al. Historical control data of neoplastic lesions in the Wistar Hannover Rat among eight 2-year carcinogenicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 3, p. 243-253, Mar 2013.

CARONE, G.; COSTELLO, D.; GUARDIA, N.D.; et al. The economic impact of ageing populations in the EU25 Member States. **European Economy**, v. 236, p. 1-56, Jan 2006.

CARVALHO, L. R. R. A.; PEREIRA, H. C. S.; SILVA, H. T.; et al. Creolin® administered by different pathways in rats experimentally poisoned with Bothrops jararaca venom. **Ciência Rural**, v. 49, n. 5, p. 1-7, Apr 2019.

CASTELLO, P. R.; DAVID, P. S.; MCCLURE, T.; et al. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 277–287, Apr 2006.

CATTERSON, J. H.; KHERICHA, M.; DYSON, M. C. Short-term, intermittent fasting induces long-lasting gut health and TOR-independent lifespan extension. **Current Biology**, v. 28, n. 11, p. 1714–1724, Jun 2018.

CHEN, L-J.; YANG, Z-X.; WANG, Y; et al. Single xenotransplant of rat brown adipose tissue prolonged the ovarian lifespan of aging mice by improving follicle survival. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. 1-19, Dec 2019.

CHO, S. J.; STOUT-DELGADO, H. D. Aging and Lung Disease. **Annual Review of Physiology**, v. 82, p. 433-459, Nov 2019.

COGGAN, A. R.; HOFFMAN, R. L.; GRAY, D. A.; et al. A single dose of dietary nitrate increases maximal knee extensor angular velocity and power in healthy older men and women. **Journals of Gerontology: Medical Sciences**, v. 75, n. 6, p. 1154-1160, May 2020.

COGNUM, S. Q.; REIS, W. L.; SILVA, M. S.; et al. Sex and age dependent differences in the hormone and drinking 2 responses to water deprivation. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 318, n. 3, p. 567-578, Mar 2020.

COLMAN, R. J.; ANDERSON, R. M.; JOHNSON S. C.; et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 201–204, Jul 2009.

COLMAN, R. J.; BEASLEY, T. M.; KEMNITZ, J. W.; et al. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 35-57, Apr 2014.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA) – Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**. Resolução N° 45, de 22 de outubro de 2019, p. 54.

CORDERO-HERRERA, I. KOZYRA, M.; ZHUGE, Z.; et al. AMP-activated protein kinase activation and NADPH oxidase inhibition by inorganic nitrate and nitrite prevent liver steatosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 1, p. 217-226, Jan 2019.

COSBY, K.; PARTOVI, K. S.; CRAWFORD, J. H.; et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1498–1505, Dec 2003.

DAVIS, E. J.; LOBACH, I.; DUBAL, D. B. Female XX sex chromosomes increase survival and extend lifespan in aging mice. **Aging Cell**, v. 18, n. 1, p. 1-5, Feb 2019.

DELGADO, M. F. G.; ZAMORA, A. G.; GONSEBATT, M. E.; et al. Subacute intoxication with sodium nitrate induces hematological and biochemical alterations and liver injury in male Wistar rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 48-55, Dec 2018.

DEMETRIUS, L. Aging in mouse and human systems: a comparative study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, p. 66-82, May 2006.

DENIC, A.; GLASSOCK, R. J.; RULE, A. D. Structural and Functional Changes with the Aging Kidney. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 23, n. 1, p. 19-28, Jan 2016.

DONG, X.; MILHOLLAND, B., VIJG, J. Evidence for a limit to human lifespan. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 257-259, Oct 2013.

DONG, Z., SINHA, R.; RICHIE Jr. J. P. Disease prevention and delayed aging by dietary sulfur amino acid restriction: Translational implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1418, n. 1, p. 44–55, Apr 2018.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P.; Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, n. 2016, p. 244-248, May 2016.

EISENBERG, T.; ABDELLATIF, M.; SCHROEDER, S.; et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. **Nature Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1428–1438, Dec 2016.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A.; et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1305–1314, Nov 2009.

EKMEKCIOGLU, C. Nutrition and longevity – From mechanisms to uncertainties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, PMID: 31631676, p. 1-20. Oct 2019.

FAN, J-L.; O'DONNELL, T.; GRAY, C. L.; et al. Dietary nitrate supplementation enhances cerebrovascular CO₂ reactivity in a sex-specific manner. **Journal of Applied Physiology**, v. 127, n. 3, p. 730-769, Sep 2019.

FERNANDEZ, N.; KIDNEY, B.A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 223-233, Sep 2007.

FERRER, I; VIDAL, N. Neuropathology of cerebrovascular diseases. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 145, p. 79-114, Dec 2017.

FINCK, C. E. Evolution of the human lifespan and diseases of aging: Roles of infection, inflammation, and nutrition. **PNAS**, v. 107, n. 1, p. 1718-1724, Jan 2010.

FISHER, R.A. The genetical theory of natural selection. Oxford: **Oxford University Press**; 1930.

FLATT, T.; PARTRIDGE, L. Horizons in the evolution of aging. **BMC Biology**, v. 16, n. 93, p. 1-13, Aug 2018.

FOLCH, J.; BUSQUETS, O.; ETTCHETO, M.; et al. Experimental Models for Aging and their Potential for Novel Drug Discovery. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 10, p. 1466-1483, Jun 2018.

FRANÇA-SILVA, M. S.; MONTEIRO, M. M. O.; QUEIROZ, T. M.; et al. The new nitric oxide donor 2-nitrate-1,3-dibuthoxypropan alters autonomic function in spontaneously hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 171, n. 1-2, p. 28-35, Nov 2012.

FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; PARINI, P.; et al. Inflammaging: a new immune– metabolic viewpoint for age- related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 576-590, Oct 2018.

FRIJHOFF, J.; WINYARD, P. G.; ZARKOVIC, N.; et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144-1170, Nov 2015.

GAO, X.; YANG, T.; LIU, M.; et al. NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 161-170.

GAO, X.; YANG, T.; LIU, M.; et al. NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, v. 65, n. 1, p. 161-170, Jan 2015.

GEORGE, B.; SEALS, S.; ABAN, I. Survival analysis and regression models. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 21, n. 4, p. 696-694, Aug 2014.

GHEIBI, S.; JEDDI, S.; CARLSTROM, M.; et al. Effects of long-term nitrate supplementation on carbohydrate metabolism, lipid profiles, oxidative stress, and inflammation in male obese type 2 diabetic rats. **Nitric Oxide**, v. 75, p. 27-41, May 2018.

GILCHRIST, M.; WINYARD, P. G.; BENJAMIN, N. Dietary nitrate – Good or bad? **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 104–109, Feb 2010.

GONZALEZ, F. M.; SHIVA, S.; VINCENT, P. S.; et al. Nitrite anion provides potent cytoprotective and antiapoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, n. 23, p. 2986–2994, Jun 2008.

GREEN, S. J. Covid-19 accelerates endothelial dysfunction and nitric oxide deficiency. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 4-5, p. 149-150, Jun 2020.

GUEST, P. C. Of mice, whales, jellyfish and men: In pursuit of increased longevity. Cap. 1. In: GUEST, P. C. **Reviews on biomarker studies in aging and anti-aging research**. 1 ed. Campinas: Springer, 2019. p. 1-279.

Guimarães, D. D.; Cruz, J. C.; Carvalho-Galvão, A.; et al. Dietary Nitrate Reduces Blood Pressure in Rats With Angiotensin II–Induced Hypertension via Mechanisms That Involve Reduction of Sympathetic Hyperactivity. **Hypertension**, v. 73, n. 4, p. 839-848, Apr 2019.

GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. **Hypertension**, v. 70, n. 4, p. 660-667, Oct 2017.

HALDANE, J. B. S. New paths in genetics. London: **Allen and Unwin**; p. 206, 1941.

HAMED, S. A. Neurologic conditions and disorders of uremic syndrome of chronic kidney disease: presentations, causes, and treatment strategies. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 61-90, Jan 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, v. 275, n. 3-6, p. 257-266, Sep 1992.

HAUN, C. T.; KEPHART, W. C.; HOLLAND, A. M. et al. Differential vascular reactivity responses acutely following ingestion of a nitrate rich red spinach extract. **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 11-12, p. 2267-2279, Dec 2016.

HAYBAR, H.; SHAHRABI, S.; REZAEYAN, H. et al. Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease. **Cardiovascular Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 13-22, Feb 2019.

HILL, T. R.; MENDONÇA, N.; GRANIC, A.; et al. What do we know about the nutritional status of the very old? Insights from three cohorts of advanced age from the UK and New Zealand. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 3, p. 420-430, Aug 2016.

HJELMBORG, J. B.; IACHINE, I.; SKYTTE, A. Genetic influence on human lifespan and longevity. **Human Genetics**, v. 119, p. 312-321, Feb 2006.

HOMMOS M. S.; GLASSOCK, R. J.; RULE, A. D. Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 10, p. 2838-2844, Oct 2017.

HOOPER, L. Why, Oh Why, Are So Many Older Adults Not Drinking Enough Fluid? **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 116, n. 5, p. 774-778, May 2016.

HOOPER, L.; BUNN, D.; JIMOH, F. O.; et al. Water-loss dehydration and aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 136-137, n. 2014, p. 50-58, Mar 2014.

HUNT, N. J.; KANG, S. W. S.; LOCKWOOD, G. P.; et al. Hallmarks of Aging in the Liver. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1151-1161, Aug 2019.

INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1-19, Jan 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Tábua Completa de Mortalidade para o Brasil – 2018 - **Breve análise da evolução da mortalidade no Brasil**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao.html>>. Acesso em: Jan 2021.

JACKSON, J. K.; ZONG, G.; MACDONALD-WICKS, L. K. Dietary nitrate consumption and risk of coronary heart disease in women from the Nurses' Health Study. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 7, p. 831-838, Apr 2019.

JIA, G.; AROOR, A. R.; JIA, C.; et al. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 7, p. 1802-1809, Jul 2019.

JONES, A. M.; THOMPSON, C.; WYLIE, L. J. Dietary Nitrate and Physical Performance. **Annual Review of Nutrition**, v. 38, p. 303-328, Aug 2018.

JONES, A. M.; THOMPSON, C.; WYLIE, L. J.; et al. Dietary nitrate and physical performance. **Annual Review of Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 303–328, Aug 2018.

JONES, R. R.; WEYER, P. J.; DELLAVALLE, C. T.; et al. Ingested nitrate, disinfection by-products, and kidney cancer risk in older women. **Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 703-711, Sep 2017.

JONVIK, K. L.; NYAKAYIRU, J.; PINCKAERS, P. J. M.; et al. Nitrate-rich vegetables increase plasma nitrate and nitrite concentrations and lower blood pressure in healthy adults. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 5, p. 986-993, Apr 2016.

KEMMER, S.; LORENZ, G.; WOBST, J.; et al. Dietary nitrate load lowers blood pressure and renal resistive index in patients with chronic kidney disease: A pilot study. **Nitric Oxide**, v. 64, p. 7-15, Apr 2017.

KHAMBATA, R. S.; GHOSH, S. M.; RATHOD K. S.; et al. Anti-inflammatory actions of inorganic nitrate stabilize the atherosclerotic plaque. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 4, p. 550–559, Jan 2017.

KHORASANI, V.; JEDDI, S.; YAGHMAEI, P.; et al. Effect of long-term sodium nitrate administration on diabetes-induced anemia and glucose homeostasis in obese type 2 diabetic male rats. **Nitric Oxide**, v. 86, p. 21-30, May 2019.

KINA-TANADA, M.; SAKANASHI, M.; TANIMOTO, A.; et al. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. **Diabetologia**, v. 60, n. 6, p. 1138–151, Jun 2017.

KLASS, M.; HIRSH, D. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 260, p. 523–525, Apr 1976.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, Y.; SHIGENO, Y.; et al. γ -Glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyl transferase as differential enzymatic sources of γ -glutamylpeptides in mice. **Amino Acids**, v. 52, n. 4, p. 555-566, Apr 2020.

KOLTOVER, V. K. Free Radical Timer of Aging: from Chemistry of Free Radicals to Systems Theory of Reliability. **Current Aging Science**, v. 10, n. 1, p. 12-17, Nov 2017.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos. Texto e atlas colorido**. 6ª ed, Porto Alegre: Artmed, 2016.

KONTIS, V.; BENNETT, J. E.; MATHERS, C. D.; et al. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. **Lancet**, v. 389, p. 1323-1335, Feb 2017.

KOZLOV, A. V.; STANIEK, K.; NOHL, H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. **FEBS Letters**, v. 454, n. 1-2, p. 127–130, Jul 1999.

KULKARNI, S. S.; CANTÓ, C. The molecular targets of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 6, p. 1114–1123, Jun 2015.

KUMAR, S. S. D.; HOURELD, N. N.; APRAHAMSE, H. Therapeutic potential and recent advances of curcumin in the treatment of aging-associated diseases. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 835-849, Apr 2018.

LACROIX, S.; CANTIN, J.; NIGAM, A. Contemporary issues regarding nutrition in cardiovascular rehabilitation. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 60, n. 1, p. 36–42, Jan 2017.

LAKATTA, E. G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 490-497, Jan 2003.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **European Journal of Neurology**, v. 25, n. 1, p. 59-70, Jan 2018.

LARSEN, F. J.; EKBLUM, B.; SAHLIN, K. et al. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2792-2793, Dec 2006.

LARSEN, F. J.; SCHIFFER, T. A.; BORNIQUEL, S.; et al. Dietary Inorganic Nitrate Improves Mitochondrial Efficiency in Humans. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 149-159, Feb 2011.

LI, H.; CUI, H.; KUNDU, T. K.; et al. Nitric Oxide Production from Nitrite Occurs Primarily in Tissues Not in the Blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 17855–17863, Jun 2008.

LI, T.; LU, X.; SUN, Y.; et al. Effects of spinach nitrate on insulin resistance, endothelial dysfunction markers and inflammation in mice with high-fat and highfructose consumption. **Food & Nutrition Research**, v. 60, n. 32010, p. 1-11, Sep 2016.

LI, Y-R.; LI, S.; LIN, C-C. Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. **BioFactors**, v. 44, n. 1, p. 69–82, Jan 2018.

LIANG, Y.; VETRANO, D. L.; QIU, C. Serum total cholesterol and risk of cardiovascular and non-cardiovascular mortality in old age: a population-based study. **BMC Geriatrics**, v. 17, n. 1, p. 1-7, Dec 2017.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, Apr 2018.

LIU, A. H.; BONDONNO, C. P.; RUSSELL, J.; et al. Relationship of dietary nitrate intake from vegetables with cardiovascular disease mortality: a prospective study in a cohort of older Australians. **European Journal of Nutrition**, v. 58, n. 7, p. 2741-2753, Oct 2019.

LONGO, V. D.; PANDA S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1048–1059, Jun 2016.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; et al. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, Jun 2013.

LÓPEZ-OTÍN, C.; GALLUZZI, L.; FREIJE, J. M. P. Metabolic control of longevity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 802-821, Aug 2016.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M.; et al. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1543–1546, Nov 1994.

LUNDBERG, J.O.; CARLSTROM, M.; LARSEN, F. J.; et al. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. **Cardiovascular Research**, v. 89, n. 3, p. 525-532, Oct 2011.

LUNDBERG, J.O.; CARLSTROM, M.; WEITZBERG, E. Metabolic effects of dietary nitrate in health and disease. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 9-22, Jul 2018.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 62, n. 4, p. 616–629, Jan 2013.

LUTTRELL, M.; KIM, H.; SHIN, S. Y.; et al. Heterogeneous effect of aging on vasorelaxation responses in large and small arteries. **Physiological Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, Jan 2020.

MA, S.; GLADYSHEV, V. N. Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 70, p. 190–203, Oct 2017.

MADEO, F.; EISENBERG, T.; PIETROCOLA, F.; et al. Spermidine in health and disease. **Science**, v. 359, n. 6374:aan2788, Jan 2018.

MAESO-DÍAZ, R.; ORTEGA-RIBERA, M.; FERNÁNDEZ-IGLESIAS, A.; et al. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. **Aging Cell**, v. 16, n. 6, p. 1-14, Dec 2018.

MANSKIKH, V. N. The Problem of Determination of Cause of Laboratory Animal's Death: A Critical Review of Definitions of "Fatal" and "Incidental" Lesions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 10, p. 1075-1080, Oct 2014.

MARTÍNEZ, Y.; LI, X. LIU, G. The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. **Amino Acids**, v. 49, n. 12, p. 2091-2098, Dec 2017.

MATZ, R. L.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Age-Related Endothelial Dysfunction. **Drugs & Aging**, v. 20, p. 527-550, Sep 2003.

MATZ, R. L.; SOTOMAYOR, M. A.; SCHOTT, C.; et al. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 2, p. 303-311, Sep 2000.

McCAY, C.M.; MAYNARD, L.A.; SPERLING, G.; et al. Retarded growth, lifespan, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. **The Journal of Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1-13, Dec 1939.

MELCHIORETTO, E. F.; ZENI, M.; VERONEZ, D. A. L.; et al. Quantitative analysis of the renal aging in rats. Stereological study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 346-352, May 2016.

MENEZES, E. F.; PEIXOTO, L. G.; TEIXEIRA, R. R.; et al. Potential Benefits of Nitrate Supplementation on Antioxidant Defense System and Blood Pressure Responses after Exercise Performance. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. 7218936, p. 1-11, Mar 2019.

MEUTEN, D. Avaliação e Interpretação Laboratorial do Sistema Urinário. *In*: Thrall M. A. (org.). **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MILLER, R. A.; NADON, N. L. Principles of animal use for gerontological research. **Journals of Gerontology: Medical Sciences**, v. 55, n. 3, p. 117-123, Mar 2000.

MIOT, H. A. Survival analysis in clinical and experimental studies. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 16, n. 4, p. 267-269, Dec 2017.

MIRZAEI, H.; SUAREZ, J. A.; LONGO, V. D. Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 11, p. 558-566, Nov 2014.

MODIN, A.; BJORNE, H.; HERULF, M.; et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of "acidic-metabolic" vasodilation. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 171, n. 1, p. 9-16, Jan 2001.

MORETTI, C. H.; SCHIFFER, T. A.; MONTENEGRO, M. F.; et al. Dietary nitrite extends lifespan and prevents age-related locomotor decline in the fruit fly. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 160, p. 860-870, Nov 2020.

MULLER, K. Azotemia in rabbits and rodents - an update. **Tierarztl Prax Ausg Kleintiere Heimtiere**, v. 47, n. 1, p. 37-47, Feb 2019.

NAKAGAWA, P.; GOMEZ, J.; GROBE, J. L.; et al. The renin-angiotensin system in the central nervous system and its role in blood pressure regulation. **Current Hypertension Reports**, v. 22, n. 7, p. 1-10, Jan 2020.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). National Library of Medicine – Pubmed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: Jan 2021

NICOLLI, T.; PARTRIGDE, L. Ageing as a risk factor for disease. **Current Biology**, v. 22, p. 741-752, Sep 2012.

NORTH, B. J.; SINCLAIR, D. A. The intersection between aging and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 110, n. 8, p. 1097-1108, Apr 2012.

NOSSAMAN, V. E.; NOSSAMAN, B. D.; KADOWITZ, P. J. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. **Cardiology in Review**, v. 18, n. 4, p. 190-197, Aug 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, Jun 1979.

OMAR, S. A.; ARTIME, E.; WEBB A. J. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric oxide**, v. 26, n. 4, p. 229-240, May 2012.

OMAR, S. A.; WEBB, A. J.; LUNDBERG, J. O.; et al. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 279, n. 4, p. 315-336, Apr 2016.

OMODEI, D.; FONTANA, L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1537-1542, Jun 2011.

ONO, Y.; KAWACHI, S.; HAYASHIDA, T.; et al. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cell populations. **Surgery**, v. 150, n. 2, p. 154-161, Aug 2011.

PANENI, F.; CAÑESTRO, C. D.; LIBBY, P. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 15, p. 1952-1967, Apr 2017.

PARTRIGDE, L.; DEELEN, J.; SLAGBOOM, E. Facing up to the global challenges of ageing. **Nature**, v. 561, p. 45-56, Sep 2018.

PENG, R.; LUO, M.; TIAN, R.; et al. Dietary nitrate attenuated endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat

diet: A critical role for NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 689, p. 1-38, Aug 2020.

PIBIRI, M. Liver regeneration in aged mice: new insights. **Aging (Albany NY)**, v. 10, n. 8, p. 1801-1824, Aug 2018.

PIGNATELLI, P.; MENICHELLI, D.; PASTORI, D.; et al. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. **Kardiologia Polska**, v. 76, n. 4, p. 713-722, Mar 2018.

PIGNOLO, R. J. Exceptional human longevity. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 110–24, Jan 2019.

PISKOVATSKA, V.; STEFANYSHYN, N.; STOREY, K. B.; et al. Metformin as a geroprotector: Experimental and clinical evidence. **Biogerontology**, v. 20, n. 1, p. 33–48, Feb 2019.

PLATZER, M.; ENGLERT, C. *Nothobranchius furzeri*: A Model for Aging Research and More. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 9, p. 543-552, Sep 2016.

POTERACKI, J.; WALSH, K. M. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews. **Toxicological Sciences**, v. 45, n. 1, p. 1-8, Sep 1998.

PU, Y.; ZHANG, H.; WANG P.; et al. Dietary curcumin ameliorates aging-related cerebrovascular dysfunction through the AMPK/uncoupling protein 2 pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1167–1177, Nov 2013.

RAMDIAL, K.; FRANCO, M. C.; ESTEVEZ, A. G. Cellular Mechanisms of Peroxynitrite-Induced Neuronal Death. **Brain Research Bulletin**, v. 133, p. 4-11, Jul 2017.

RAMMOS, C.; HENDGEN-COTTA, U. B.; SOBIERAJSKI, J.; et al. Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 15, p. 1584-1585, Apr 2014.

RAMMOS, C.; TOTZECK, M.; DEENEN, R.; et al. Dietary Nitrate Is a Modifier of Vascular Gene Expression in Old Male Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n. 658264, p. 1-13, Mar 2015.

REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson's Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 2, p. 337-350, Mar 2019.

RIZZUTO, D.; FRATIGLIONI, L. Lifestyle factors related to mortality and survival: a mini-review. **Gerontology**, v. 60, p. 327–335, Feb 2014.

ROILA, R.; BRANCIARI, R.; STACCINI, B.; et al. Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 3, p. 168-173, Nov 2018.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 404680, p. 1-17, Mar 2014.

SALEHZADEH, H.; MALEKI, A.; REZAEI, R.; et al. The nitrate content of fresh and cooked vegetables and their health-related risks. **PloS One**, v. 15, n. 1:e0227551, Jan 2020.

SANTOLLO, J.; DANIELS, D. Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, n. 25, p. 1-11, Mar 2015.

SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A-M.; DANIELS, D. Sex differences in the drinking response to angiotensin II (AngII): Effect of body weight. **Hormones and Behavior**, v. 93, p. 128-136, Jul 2017.

SCHOBER, P.; VETTER, T. R. Survival analysis and interpretation of time-to-event data: The tortoise and the hare. **Anesthesia & Analgesia**, v. 127, n. 3, p. 792-798, Sep 2018.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624-630, Jun 2013.

SHEN, P.; YUE, Y.; PARK, Y. A Living Model for Obesity and Aging Research: *Caenorhabditis elegans*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 741-754, Mar 2018.

SHISHODIA, S. Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 37–55, Feb 2013.

SHIVA, S.; HUANG, S.; GRUBINA, R.; et al. Deoxymyoglobin Is a Nitrite Reductase That Generates Nitric Oxide and Regulates Mitochondrial Respiration. **Circulation Research**, v. 100, n. 5, p. 654–661, Mar 2007.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**, 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIM, M.; LEWIS, J. R.; BLEKKENHORST, L. C.; et al. Dietary nitrate intake is associated with muscle function in older women. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 3, p. 601-610, Mar 2019.

SIMSEK, B., YANAR, K.; KANSU, A. D. Caloric restriction improves the redox homeostasis in the aging male rat heart even when started in middle-adulthood and when the body weight is stable. **Biogerontology**, v. 20, n. 1, p. 127–140, Feb 2019.

SINGH, P. P.; DEMMITT, B. A.; NATH, R. D.; et al. The genetics of aging: a vertebrate perspective. **Cell**, v. 177, n. 1, p. 200-220, Mar 2019.

SNYDER, J. M.; SNIDER, T. A.; CIOL, M. A.; et al. Validation of a geropathology grading system for aging mouse studies. **Geroscience**, v. 41, n. 4, p. 455-465, Aug 2019.

SNYDER, J. M.; WARD, J. M.; TREUTING, P. M. Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 233-243, Mar 2015.

SOBAMOWO, H.; PRABHAKAR, S. S. The Kidney in Aging: Physiological Changes and Pathological Implications. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 146, p. 303-340, Feb 2017.

SOLIMAN, G. A. Dietary Cholesterol and the Lack of Evidence in Cardiovascular Disease. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 1-14, Jun 2018.

SOLON-BIET, S. M.; MCMAHON, A. C.; BALLARD, J. W. O.; et al. The ratio of macronutrients, not caloric intake, dictates cardiometabolic health, aging, and longevity in ad libitum-fed mice. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 418–430, Mar 2014.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 545–548, Dec 1976.

STOCKMAN, M-C.; THOMAS, D.; BURKE, J.; et al. Intermittent fasting: Is the wait worth the weight? **Current Obesity Reports**, v. 7, n. 2, p. 172–185, Jun 2018.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 46, p. 8459-8467, Dec 2013.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympatic neurogenic contraction of rat mesenteric. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1602-1608, Dec 1999.

TIAN, R.; PENG, R.; YANG, Z.; et al. Supplementation of dietary nitrate attenuated oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic vasculature through inhibition of NADPH oxidase. **Nitric Oxide**, v. 96, p. 54-63, Mar 2020.

TREUTING, P. M.; SNYDER, J. M.; IKENO, Y.; et al. The Vital Role of Pathology in Improving Reproducibility and Translational Relevance of Aging Studies in Rodents. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 244-249, Mar 2016.

TROTTE, M. N. S.; MENEZES, R. C.; TORTELLY, R. Spontaneous neoplasms in Wistar rats from a center for laboratory animal breeding of the Rio de Janeiro state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2549-2551, Dec 2008.

VAN DER AVOORT, C. M. T.; VAN LOON, L. J. C.; HOPMAN, M. T. E.; et al. Increasing vegetable intake to obtain the health promoting and ergogenic effects

of dietary nitrate. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 11, p. 1485-1489, Nov 2018.

VANIN, A. F.; BEVERS, L. M.; SLAMA-SCHWOK, A.; et al. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 1, p. 96–103, Jan 2007.

VIDAČEK, N. S.; NANIĆ, L.; RAVLIĆ, S.; et al. Telomeres, nutrition, and longevity: can we really navigate our aging? **Journals of Gerontology: Biological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 39-47, Dec 2017.

WADHWA, R.; GUPTA, R.; MAURYA, P. K. Oxidative Stress and Accelerated Aging in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorder. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4711-4725, Dez 2018.

WALSH, K. M.; POTERACKI, J. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 65-72, Jan 1994.

WAN, Q-L; MENG, X.; FU, X.; et al. Intermediate metabolites of the pyrimidine metabolism pathway extend the lifespan of *C. elegans* through regulating reproductive signals. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 12, p. 3993-4010, Jun 2019.

WANG, H.; HU, L.; LI, L.. et al. Inorganic nitrate alleviates the senescence-related decline in liver function. **Science China Life Sciences**, v. 61, n. 1, p. 24-34, Jan 2018.

WARD, M. H.; JONES, R. R.; BRENDER, J. D.; et al. Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7, p. 1-31, Jul 2018.

WEI, M.; BRANDHORST, S.; SHELEHCHI, M.; et al. Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 377:eaai8700, Feb 2017.

WISEMAN, H; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemical Journal**, v. 313, n. 1, p. 17-29, Jan 1996.

WOESSNER, M.; SMOLIGA, J. M.; TARZIA, B.; et al. A stepwise reduction in plasma and salivary nitrite with increasing strengths of mouthwash following a dietary nitrate load. **Nitric oxide**, v. 54, p. 1-7, Apr 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Health Observatory (GHO) data – The data repository. Disponível em: <<https://www.who.int/gho/database/en/>>. Acesso em: Jan 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Nitrate and nitrite in drinking-water - Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/75380>>. Acesso em: Jan 2021.

WYSS-CORAY, T.; Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180-186, Nov 2016.

XUE, B.; JOHNSON, A. K.; HAY, M. Sex differences in angiotensin II- and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 5, p. 459-463, Sep 2013.

YANG, T.; ZHANG, X-M.; TARNAWSHI, L.; et al. Dietary nitrate attenuates renal ischemiareperfusion injuries by modulation of immune responses and reduction of oxidative stress. **Redox Biology**, v. 13, p. 320-330, Jun 2017.

YANG, Y-H. K.; OGANDO, C. R.; SEE, C. W.; et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-14, May 2018.

YI, S-W.; YI, J-J.; OHRR, H. Total cholesterol and all-cause mortality by sex and age: a prospective cohort study among 12.8 million adults. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, Feb 2019.

YOON, H. E.; CHOI, B. S. The renin-angiotensin system and aging in the kidney. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 29, n. 3, p. 291-295, May 2014.

ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 6 ed. Rio de Janeiro, GEN Guanabara Koogan; 2018, 1408p.

ZHANG, Z.; NAUGHTON, D.; WINYARD, P. G.; et al. Generation of Nitric Oxide by a Nitrite Reductase Activity of Xanthine Oxidase: A Potential Pathway for Nitric Oxide Formation in the Absence of Nitric Oxide Synthase Activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 3, p. 767-772, Aug 1998.

ZIMMERMANN, A.; HOFER, S.; PENDL, T.; et al. Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 6, p. 1-34, Sep 2018.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba - CEUA-UFPB.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do consumo de nitrato inorgânico sobre a longevidade de ratos Wistar", protocolada sob o CEUA nº 1975060318 (ID 000411), sob a responsabilidade de **Valdir de Andrade Braga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 22/03/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of inorganic nitrate consumption on longevity of Wistar rats", utilizing 200 Heterogenic rats (males and females), protocol number CEUA 1975060318 (ID 000411), under the responsibility of **Valdir de Andrade Braga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 03/22/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de *04/2018* a *04/2020* Área: *Biotecnologia*

Origem:	Unidade de Produção Animal - IPeFarM		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas
		idade:	11 a 12 meses
		N:	200
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar	Peso:	350 a 450 g

Local do experimento: Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial - LACONCHA, CBIotec, UFPB

João Pessoa, 22 de março de 2018

Prof. Dra. Islânia Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 2: Quantidade de amostras analisadas nos testes bioquímicos em relação ao tempo de experimento (FP = Fêmea Placebo; FN = Fêmea Nitrato; MP = Macho Placebo; MN = Macho Nitrato).

		IDADE (MESES)						
		15	18	21	24	27	30	33
MDA	FP	18	13	18	9	10	7	6
	FN	16	13	15	7	10	7	6
	MP	11	10	11	16	4	3	2
	MN	13	12	13	18	7	1	4
CREATININA	FP	16	19	14	8	8	4	5
	FN	13	15	10	11	9	6	5
	MP	11	11	6	7	5	8	2
	MN	16	13	6	7	6	6	3
UREIA	FP	18	19	16	8	9	9	5
	FN	13	18	10	12	9	5	6
	MP	12	14	7	6	5	9	2
	MN	16	14	8	8	6	8	3
ALT	FP	16	17	16	7	9	6	5
	FN	13	16	10	10	9	5	6
	MP	8	11	6	6	5	8	2
	MN	16	14	7	8	6	8	3
AST	FP	18	19	15	6	9	4	4
	FN	13	17	10	12	9	3	6
	MP	12	14	7	6	5	5	2
	MN	16	14	7	8	5	8	2
FA	FP	18	19	15	7	9	7	5
	FN	15	16	10	12	9	6	6
	MP	12	14	7	6	5	8	2
	MN	16	14	7	8	5	9	2
GGT	FP	16	17	16	8	8	5	3
	FN	12	16	8	12	9	4	6
	MP	12	8	7	6	3	5	1
	MN	16	12	7	8	5	7	3
COLESTEROL TOTAL	FP	15	17	12	8	7	8	5
	FN	12	15	8	5	8	4	6
	MP	11	11	5	6	5	9	2
	MN	15	13	7	8	6	8	3
HDL	FP	7	9	12	6	5	2	1
	FN	8	13	6	6	5	3	1
	MP	8	5	1	6	3	3	1
	MN	8	6	1	6	5	7	1

Anexo 3: Produção científica durante o período de doutoramento. Artigos publicados em periódicos de alto impacto (IF 9,98) em colaboração com o Karolinska Institutet na Suécia.



I ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Certificamos que

o trabalho intitulado “**Avaliação do consumo de nitrato inorgânico sobre a longevidade de ratos wistar**” dos autores **Carvalho, L.R.R.A., Flôr, A.F.L., Leite, E.G., Ruiz, C.R., Dinatto, A.M.F., Andrade, J.T., Oliveira, M.M., Balarini, C.M., Guimarães, D.D., Moretti, C., Lungberg, J., Weitzberg, E., Carlström, M., Braga, V.**, apresentado na modalidade **oral**, recebeu **menção honrosa** no I Encontro Científico de Pós-graduação do Centro de Biotecnologia, realizado no Centro de Biotecnologia/UFPB no período de 05 a 07 de junho de 2019.

Coordenador do PMPGCF-UFPB

Presidente da Comissão Organizadora

I ECPPG-CBiotec



Certificamos que o trabalho intitulado *“Consumo de nitrato de sódio (NANO3) sobre a longevidade de ratos wistar – análise sistemática das curvas de sobrevivência”* com autoria de **LUCAS RANNIER RIBEIRO ANTONINO CARVALHO, DRIELLE DANTAS GUIMARÃES, CLARA RITTMAYER RUIZ, JULIANA TELES DE ANDRADE, ERICKA GARCIA LEITE, ATALIA FERREIRA L. FLÔR, EDDIE WEITZBERG, JON LUNDBERG, MATTIAS CARLSTRÖM, VALDIR DE ANDRADE BRAGA**, foi apresentado, na modalidade oral, no II Simpósio Nordestino de Integração em Ciências Fisiológicas, realizado nos dias 21 e 22 de outubro de 2020, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, com carga horária de 20h.

João Henrique de Costa-Silva

Prof. Dr. João Henrique Costa-Silva
Coordenador do evento

Viviane de Oliveira Nogueira Souza

Profa. Dra. Viviane de Oliveira Nogueira Souza
Vice-coordenadora do evento

Vitória de Santo Antão, 26 de outubro de 2020



Certificamos que o trabalho intitulado *“Caracterização morfológica das neoplasias espontaneamente desenvolvidas em ratos wistar idosos utilizados para estudos fisiológicos de longevidade”* com autoria de **LUCAS RANNIER RIBEIRO ANTONINO CARVALHO, DRIELLE DANTAS GUIMARÃES, CLARA RITTMAYER RUIZ, APOLLO MARCEL F. DINATTO, ERICKA GARCIA LEITE, ATALIA FERREIRA L. FLÔR, EDDIE WEITZBERG, JON LUNDBERG, MATTIAS CARLSTRÖM, VALDIR DE ANDRADE BRAGA**, foi apresentado, na modalidade oral, no II Simpósio Nordestino de Integração em Ciências Fisiológicas, realizado nos dias 21 e 22 de outubro de 2020, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, com carga horária de 20h.

João Henrique de Costa-Silva

Prof. Dr. João Henrique Costa-Silva
Coordenador do evento

Viviane de Oliveira Nogueira Souza

Profa. Dra. Viviane de Oliveira Nogueira Souza
Vice-coordenadora do evento

Vitória de Santo Antão, 26 de outubro de 2020





I ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

Certificamos que

Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho
apresentou o trabalho intitulado “**AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE NITRATO INORGÂNICO SOBRE A LONGEVIDADE DE RATOS WISTAR**” dos autores **Lucas Rannier R. A. Carvalho, Atalia Ferreira L. Flôr, Ericka G. Leite, Clara R. Ruiz, Apollo M. F. Dinatto, Juliana T. de Andrade, Matheus M. de Oliveira, Camile M. Balarini, Drielle D. Guimarães, Chicara Moretti, Jon Lungberg, Eddie Weitzberg, Mattias Carlström e Valdir A. Braga** na modalidade **oral** durante o I Encontro Científico de Pós-graduação do Centro de Biotecnologia, realizado no Centro de Biotecnologia/UFPB, no período de 05 a 07 de junho de 2019.



Presidente da Comissão Organizadora
I ECPPG-CBiotec

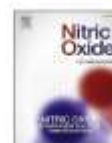


Coordenador do PMPGCF-UFPB



Contents lists available at ScienceDirect

Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox

The new organic nitrate 2-nitrate-1,3-diocthanoxypropan (NDOP) induces nitric oxide production and vasorelaxation via activation of inward-rectifier potassium channels (K_{IR})

Ricardo Bernardino-Paula^a, Alynne Carvalho-Galvão^b, Airla L.M. Cavalcanti^a, Patrícia K. L. Rocha^a, Lucas R.R.A. Carvalho^a, Maria C.R. Brandão^b, Petronio F. Athayde-Filho^b, Thiago F. Diniz^c, Virginia S. Lemos^c, Maria S. França-Silva^a, Marcelo F. Montenegro^d, Eddie Weitzberg^d, Jon O. Lundberg^d, Mattias Carlström^{d,1}, Valdir A. Braga^{a,c,d,*,1}

^a Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Chemistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^c Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:
Organic nitrate
Nitric oxide donor
 K^+ channels
Xanthine oxidoreductase

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases are coupled to decreased nitric oxide (NO) bioavailability, and there is a constant search for novel and better NO-donors. Here we synthesized and characterized the cardiovascular effects of the new organic nitrate 2-nitrate-1,3-diocthanoxypropan (NDOP).

Methods: A combination of *in vitro* and *in vivo* experiments was performed in C57BL/6 mice and Wistar rats. Thus, the ability of NDOP in donating NO in a cell-free system and in vascular smooth muscle cells (VSMC) and its ability to induce vasorelaxation in aortic rings from mice were evaluated. In addition, changes in blood pressure and heart rate to different doses of NDOP were evaluated in conscious rats. Finally, acute pre-clinical toxicity to oral administration of NDOP was assessed in mice.

Results: In cell-free system, NDOP increased NO levels, which was dependent on xanthine oxidoreductase (XOR). NDOP also increased NO levels in VSMC, which was not influenced by endothelial NO synthase. Furthermore, incubation with the XOR inhibitor febuxostat blunted the vasorelaxation in aortic ring preparations. In conscious rats, NDOP elicited dose-dependent reduction in blood pressure accompanied with increased heart rate. In vessel preparations, NDOP (10^{-8} – 10^{-5} mol/L) induced endothelium-independent vasorelaxation, which was inhibited by the NO scavengers 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide and hydroxocobalamin or by inhibition of soluble guanylyl cyclase using H-115211 metformin [4,3-oligomycin-1-one]. To investigate if NDOP acts through potassium channels, selective blockers were used. Inhibition of IR , K_v or K_{ATP} subtypes of potassium channels had no effect, but inhibition of inward-rectifier potassium channels (K_{IR}) significantly reduced NDOP-mediated vasorelaxation. Lastly, NDOP showed low toxicity (LD_{50} = 5000 mg/kg).

Conclusion: Bioactivation of NDOP involves functional XOR, and this new organic nitrate elicits vasorelaxation via NO-cGMP-PKG signaling and activation of K_{IR} channels. Future studies should further characterize the underlying mechanism and evaluate the therapeutic benefits of chronic NDOP treatment in relevant cardiovascular disease models.

1. Introduction

Cardiovascular disorders including hypertension, coronary heart disease, and cerebrovascular disease are major causes of morbidity and

mortality worldwide. The underlying mechanisms contributing to the development and the progression of these diseases, and associated adverse complications, are considered multifactorial but surely involve endothelial dysfunction, compromised function of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and oxidative stress [1–3].

* Corresponding author. Federal University of Paraíba, Biotechnology Center Campus I – Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, CEP: 58051-900, Brazil.

E-mail address: valdir@biotec.ufpb.br (V.A. Braga).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.10.001>

Received 21 May 2020; Received in revised form 27 August 2020; Accepted 1 October 2020

Available online 7 October 2020

1089-8603/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



Research Paper

Renovascular effects of inorganic nitrate following ischemia-reperfusion of the kidney



Gensheng Zhang^{a,b,1}, Huirong Han^{a,c,1}, Zhengbing Zhuge^a, Fang Dong^d, Shan Jiang^d, Wenwen Wang^e, Drielle D. Guimarães^a, Tomas A. Schiffer^a, En Yin Lai^g, Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho^f, Ricardo Barbosa Lucena^g, Valdir A. Braga^h, Eddie Weitzberg^a, Jon O. Lundberg^a, Mattias Carlstrom^{a,*}

^a Dept. of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

^b Dept. of Neurobiology, Institute of Neuroscience, NHC, and CAMS Key Laboratory of Medical Neurobiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China

^c Dept. of Anesthesiology, Shandong Provincial Medicine and Health Key Laboratory of Clinical Anesthesia, Weifang Medical University, Weifang, China

^d Dept. of Physiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China

^e Dept. of Pathology, Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China

^f Dept. of Biotechnology – Federal University of Paraíba, Avão Pessoa, PB, Brazil

^g Dept. of Veterinary Science – Federal University of Paraíba, Avão, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute kidney injury
Endothelial cells
Inorganic nitrate
Mitochondria
Nitric oxide
Oxidative stress

ABSTRACT

Background: Renal ischemia-reperfusion (IR) injury is a common cause of acute kidney injury (AKI), which is associated with oxidative stress and reduced nitric oxide (NO) bioactivity and increased risk of developing chronic kidney disease (CKD) and cardiovascular disease (CVD). New strategies that restore redox balance may have therapeutic implications during AKI and associated complications.

Aim: To investigate the therapeutic value of boosting the nitrite-nitrite-NO pathway during development of IR-induced renal and cardiovascular dysfunction.

Methods: Male C57BL/6 J mice were given sodium nitrate (10 mg/kg, i. p.) or vehicle 2 h prior to warm ischemia of the left kidney (45 min) followed by sodium nitrate supplementation in the drinking water (1 mmol/kg/day) for the following 2 weeks. Blood pressure and glomerular filtration rate were measured and blood and kidneys were collected and used for biochemical and histological analyses as well as renal vessel reactivity studies. Glomerular endothelial cells exposed to hypoxia-reoxygenation, with or without angiotensin II, were used for mechanistic studies.

Results: IR was associated with reduced renal function and slightly elevated blood pressure, in combination with renal injuries, inflammation, endothelial dysfunction, increased Ang II levels and Ang II-mediated vasoactivity, which were all ameliorated by nitrate. Moreover, treatment with nitrate (in vivo) and nitrite (in vitro) restored NO bioactivity and reduced mitochondrial oxidative stress and injuries.

Conclusions: Acute treatment with inorganic nitrate prior to renal ischemia may serve as a novel therapeutic approach to prevent AKI and CKD and associated risk of developing cardiovascular dysfunction.

1. Introduction

Ischemia-reperfusion (IR) injury of the kidney, associated with transplantation, cardiac bypass surgery and shock, is a major risk for developing acute kidney injury (AKI) and subsequent chronic kidney

disease (CKD) [1]. Underlying mechanisms are complex and involve reperfusion-associated oxidative stress, nitric oxide deficiency and immune cell activation, which together leads to endothelial dysfunction [2, 3]. Ongoing research has been focused on finding new and effective therapies for preventing and treating AKI and its progression to CKD,

* Corresponding author. Associate Professor of Physiology Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet Solnavägen 9, Biomedicum 58, 17177 Stockholm, Sweden.

E-mail address: mattias.carlstrom@ki.se (M. Carlstrom).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101836>

Received 29 September 2020; Received in revised form 29 November 2020; Accepted 14 December 2020

Available online 17 December 2020

2213-2317/© 2020 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).